

**Entwicklung einer neuen Methode zur chemo- und  
regioselektiven Cys-tag Modifikation von Proteinen  
mithilfe von gespaltenen Inteinen**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem  
Fachbereich Chemie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Thomas Kurpiers**  
aus Gießen

Marburg/Lahn 2008

Vom Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am \_\_\_\_\_ angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Henning D. Mootz

Zweitgutachter: Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel

Tag der mündlichen Prüfung: 05.08.2008

*...meinen Eltern*

## Zusammenfassung

Die chemo- und regioselektive Modifikation von Proteinen mit diversen biophysikalischen funktionellen Gruppen ist von zentraler Bedeutung in der biochemischen Forschung. Alle zu diesem Zweck entwickelten Methoden unterscheiden sich prinzipiell durch die Natur der biophysikalischen Gruppe, oder die Selektivität des Einbaus in ein Zielprotein, wobei generell die strukturelle und funktionelle Integrität des zu untersuchenden Proteins durch die Modifikation erhalten bleiben soll. Traditionelle Biokonjugationstechniken bedienen sich beispielsweise häufig der Cysteinseitenkette, die aufgrund der einzigartigen chemischen Reaktivität der Thiolgruppe und des relativ geringen natürlichen Vorkommens in Proteinen ein geeignetes Ziel für Modifikationsreaktionen darstellt. Die Cysteinmodifikation mit verschiedenen funktionellen Gruppen verläuft jedoch nur in Proteinen mit einem einzigen Cysteinrest streng regioselektiv und kann deshalb für Proteine mit essentiellen oder mit mehreren Cysteinresten nur eingeschränkt oder gar nicht angewendet werden.

In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die dieses Problem der Regioselektivität in einer zweistufigen Reaktion durch Verwendung eines gespaltenen Inteins umgeht. Dabei wird in einem ersten Schritt zunächst ein Fusionsprotein, bestehend aus einem C-terminalen Inteinfragment und einer kurzen C-terminalen Exteinsequenz, mit einem einzelnen Cystein (Cys-tag) durch ein Thiol-spezifisches Reagenz mit der gewünschten Gruppe regioselektiv modifiziert. In einem zweiten Schritt wird dieser modifizierte Cys-tag mittels *trans*-Proteinspleißen über eine stabile Peptidbindung mit einem beliebigen Zielprotein, das als Fusion mit dem komplementären N-terminalen Inteinfragment hergestellt wird, verbunden. Dadurch, dass die Modifikationsreaktion getrennt von der Proteinspleißreaktion abläuft, bleiben Cysteinreste im Zielprotein durch diese Prozedur unbeeinflusst. Eine wichtige Voraussetzung für diese Technik ist die Verfügbarkeit von gespaltenen Inteinen mit mindestens einem Cystein-freien Inteinfragment. In dieser Arbeit wurde dazu zunächst das künstlich gesplattene *Ssp* DnaB Intein verwendet, das gute Spleißausbeuten in zeit- und temperaturabhängigen Spleißreaktionen liefert. Durch das Einführen eines Cysteinrestes in eine kurze C-Exteinsequenz konnte ein Cys-tag generiert werden, der sowohl mit verschiedenen Fluorophoren, als auch mit Biotin regioselektiv modifiziert werden konnte und die nachfolgende Spleißreaktion nicht beeinträchtigte. Auch die Cystein-haltigen Proteine  $\beta$ -Laktamase und Thioredoxin, konnten als Fusionsproteine mit dem N-terminalen DnaB Inteinfragment produziert und mit dem Cys-tag regioselektiv modifiziert werden. Ihre enzymatische Aktivität wurde dadurch nicht beeinflusst. Die spontane Bildung des aktiven Inteins aus den beiden komplementären Inteinhälften konnte ferner für die Modifikation eines ungereinigten Zielproteins in einem Zelllysate ausgenutzt werden.

In einer Weiterentwicklung dieser Methode konnte erstmals ein *trans*-spleißendes Intein aus dem *Mxe* GyrA Mini-Intein generiert und biochemisch charakterisiert werden. Die Spleißproduktbildung des gespaltenen GyrA Inteins verlief dabei im Vergleich zum zuvor verwendeten DnaB Intein zwar etwas langsamer, dafür aber mit deutlich besseren Ausbeuten. Für die C-terminale Cys-tag Modifikation von Proteinen konnten sowohl Fluorophore als auch Polyethylenglykol eingesetzt werden. Die Herstellung von regioselektiv Fluorescein-modifiziertem menschlichem Wachstumshormon gelang durch die Kombination aus der Cys-tag Technik mit einem Rückfaltungsprotokoll. In einem weiteren Beispiel konnte auch die nicht-ribosomale Peptidsynthetase TycA regioselektiv mit Fluorescein modifiziert und anschließend gereinigt werden. Modifiziertes TycA zeigte in einem Produktbildungsassay unveränderte enzymatische Aktivität, verglichen mit einem vollständig rekombinant hergestellten TycA-Kontrollprotein. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die beiden verwendeten gespaltenen *Ssp* DnaB und *Mxe* GyrA Inteine orthogonal zueinander sind, d.h. beide Inteine bildeten unabhängig voneinander Spleißprodukt.



## Summary

The chemo- and regioselective introduction of synthetic moieties into proteins is of fundamental importance in basic protein and biochemical research. Several techniques have been developed for this purpose, which differ in the nature of the synthetic moiety and the selectivity of its incorporation. A general important criterion is thereby that the structural and functional integrity of the protein under investigation is preserved. In the majority of traditional bioconjugate techniques the sulfhydryl group of cysteine residues provides the most important functional target for modifications, due to its unique chemical reactivity and low natural abundance in proteins. However, cysteine modification is strictly regioselective only in proteins with a single cysteine residue and becomes severely limited or even impractical for target proteins containing essential or multiple cysteines.

The approach outlined in this work circumvents the problem of regioselectivity by a two-step procedure using a split intein. In a first step, a fusion protein consisting of a C-terminal fragment of a split intein and a short cysteine-containing C-extein sequence (Cys-tag) is modified with a sulfhydryl-reactive probe. In a second step, this labelled Cys-tag is linked to a target protein, which was expressed in fusion with the complementary split intein fragment, with a native peptide bond by protein *trans*-splicing. Thus, the modification reaction proceeds prior to the attachment and therefore leaves other native cysteine residues in the target protein unaffected. One important prerequisite for this strategy is the absence of a cysteine in the respective intein fragment. In this work the artificially split *Ssp* DnaB intein was used initially, which showed good yields in time- and temperature-dependant splicing reactions. The introduction of a cysteine residue into the previously cysteine-free C-terminal extein sequence yielded a Cys-tag, that could be efficiently labelled with various fluorophores and biotin. Neither the modified Cys-tag nor the free cysteine itself in close proximity to the active site nucleophile of the intein had an effect on the splicing activity. Moreover, the cysteine-containing *E. coli* proteins  $\beta$ -lactamase and thioredoxin could be obtained as fusions with the N-terminal DnaB intein fragment and regioselectively labelled with fluorescent probes by retaining enzymatic activity. In addition, the spontaneous association of the complementary intein fragments into its active form could be used for the specific labelling of a crude protein in a cell lysate.

In a further development of this approach, an artificially split version of the *Mxe* GyrA mini-intein could be generated, biochemically characterized and used for the Cys-tag modification of proteins. For the GyrA intein, splice product formation proceeded with slightly slower rates, but with significantly higher yields, compared to the previously used DnaB intein. In addition to the modification with fluorophores, proteins could also be modified with a polyethylene glycol moiety. The preparation of regioselectively fluorescein-labeled human growth hormone was achieved by the Cys-tag approach in combination with a renaturation protocol. The regioselective fluorescein-modification of the non-ribosomal peptide synthetase TycA served as another example, showing the broad potential of this approach. Modified and purified TycA showed the same enzymatic activity in a product formation assay compared to a recombinantly produced unmodified TycA control protein.

Moreover, the new artificially split *Mxe* GyrA intein was found to be orthogonal to the split *Ssp* DnaB intein, i.e. both inteins produced their respective splice products independently from each other.

Der Hauptteil dieser Arbeit wurde in folgenden Publikationen veröffentlicht:

**T. Kurpiers and H.D. Mootz, (2007)**

Regioselective cysteine bioconjugation by appending a labeled cysteine tag to a protein by using protein splicing in *trans*.

*Angewandte Chemie International Edition Engl.*; **46**(27): 5234-5237.

*Angewandte Chemie*; **119**, 5327-5330

**T. Kurpiers and H.D. Mootz, (2008)**

Site-specific chemical modification of proteins with a pre-labelled cysteine tag using the artificially split *Mxe* GyrA intein.

*ChemBioChem*, **Accepted**.

**S. Brenzel, T. Kurpiers, and H.D. Mootz, (2006)**

Engineering artificially split inteins for applications in protein chemistry: biochemical characterization of the split *Ssp* DnaB intein and comparison to the split *Sce* VMA intein. *Biochemistry*; **45**(6): 1571-1578.

Weitere Publikationen:

**H.D. Mootz, T. Kurpiers, C. Ludwig, S. Brenzel (2006)**

Method for the production of a chemically modified protein

Verfahren zur Herstellung eines chemisch modifizierten Proteins

*Patent Antrag*; Pub. Nr.: WO/2007/076974; Int. Appl. Nr.: PCT/EP2006/012434

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>4</b>
<b>Summary .....</b>	<b>5</b>
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>7</b>
<b>Abkürzungen .....</b>	<b>11</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>14</b>
<b>1.1 Direkte Konjugation von Aminosäuren mit funktionalisierten Sonden .....</b>	<b>16</b>
<b>1.2 Einführung von funktionellen Gruppen für bio-orthogonale Reaktionen .....</b>	<b>20</b>
<b>1.3 Fusionsproteine.....</b>	<b>23</b>
1.3.1 FAsH, ReAsH & andere Chelator-tags .....	23
1.3.2 Biotin Holoenzym Synthetase BirA .....	24
1.3.3 Proteinmodifikation mit Phosphopantetheintransferasen.....	25
1.3.4 Aldehyd-tag.....	26
1.3.5 hAGT-Fusionsproteine.....	27
1.3.6 Sortase-vermittelte Proteinmodifikation .....	28
1.3.7 Proteinmodifikation durch nicht-kovalente Interaktionen .....	28
1.3.8 Sonstige Methoden zur Proteinmodifikation mithilfe von Fusionsproteinen ..	29
<b>1.4 Intein-vermittelte Modifikationen .....</b>	<b>31</b>
1.4.1 Inteine & Proteinspleißen.....	31
1.4.2 Proteinspleißen in <i>trans</i> .....	36
<b>1.5 Chemische Ligationsreaktionen.....</b>	<b>39</b>
<b>1.6 Aufgabenstellung.....</b>	<b>42</b>
<b>2 Materialien .....</b>	<b>43</b>
<b>2.1 Verwendete Geräte.....</b>	<b>43</b>
<b>2.2 Chemikalien, Enzyme &amp; Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>44</b>
<b>2.3 Vektoren.....</b>	<b>45</b>
2.3.1 pMAL-c2X.....	45
2.3.2 pTrc99a.....	45
2.3.3 pET16b.....	45
2.3.4 pQE30.....	46
2.3.5 pQE60.....	46

2.3.6	pTXB1 .....	46
<b>2.4</b>	<b>Mikroorganismen .....</b>	<b>47</b>
2.4.1	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	47
2.4.2	<i>E. coli</i> XL1 Blue.....	47
2.4.3	<i>E. coli</i> BL21 Gold (DE3) .....	47
<b>2.5</b>	<b>Medien .....</b>	<b>48</b>
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>49</b>
<b>3.1</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>49</b>
3.1.1	Konstruktion der rekombinanten Plasmide .....	49
3.1.2	DNA-Sequenzierung .....	53
<b>3.2</b>	<b>Proteinchemische Methoden .....</b>	<b>53</b>
3.2.1	Genexpression in <i>E. coli</i> .....	53
3.2.2	Zellaufschluss.....	53
3.2.3	Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie .....	54
3.2.3.1	<i>Ni</i> <sup>2+</sup> -NTA-Chromatographie .....	54
3.2.3.2	Proteinreinigung über Amylose-Säulenchromatographie .....	55
3.2.3.3	Proteinreinigung über eine Strep-Tactin-Matrix .....	56
3.2.3.4	Reinigung von biotinylierten Proteinen über eine monomere .....	
	Avidinmatrix .....	56
3.2.3.5	Gelfiltrationschromatographie.....	57
3.2.3.6	Bestimmung der Proteinkonzentration und berechnete molare .....	
	Extinktionskoeffizienten.....	57
<b>3.3</b>	<b>Biochemische Methoden .....</b>	<b>58</b>
3.3.1	Spleißreaktionen.....	58
3.3.2	Modifikationsreaktionen .....	59
3.3.2.1	Modifikation mit Fluorescein-5-Maleinimid (FM) .....	59
3.3.2.2	Modifikation mit Maleinimid-PEO <sub>2</sub> -Biotin (BM).....	59
3.3.2.3	Modifikation mit 5-Iodacetamido-Fluorescein (5-IAF) .....	60
3.3.2.4	Modifikation mit Polyethylenglykol-5000-Maleinimid (PEG5000) .....	60
3.3.3	Herstellung der modifizierten Proteine .....	60
3.3.3.1	Herstellung von modifizierter $\beta$ -Laktamase .....	60
3.3.3.2	Herstellung von modifiziertem Thioredoxin.....	61
3.3.3.3	Herstellung von modifiziertem Wachstumshormon.....	61
3.3.3.4	Herstellung einer modifizierten nicht-ribosomalen Peptidsynthetase .....	61

3.3.3.5	<i>Proteinmodifikation in einem E. coli Zelllysate</i> .....	62
3.3.4	Enzymatische Assays .....	62
3.3.4.1	<i><math>\beta</math>-Laktamase-Assay</i> .....	62
3.3.4.2	<i>Thioredoxin-Assay</i> .....	63
3.3.4.3	<i>Sfp-vermittelte Beladung der PCP-Domäne mit der</i> .....	
	<i>Phosphopantetheingruppe</i> .....	63
3.3.4.4	<i>DKP-assay</i> .....	63
<b>3.4</b>	<b>Analytische Methoden</b> .....	<b>64</b>
3.4.1	Densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten.....	64
3.4.2	Tryptischer Verdau zur Proteinidentifizierung .....	65
3.4.3	Analytische HPLC.....	65
3.4.4	Massenspektrometrie.....	66
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>67</b>
4.1	Ausgangskonstrukte und Einfluss der Heterodimerisierungs-domänen auf die Spleißaktivität des DnaB Inteins.....	67
4.2	Entwicklung eines zweistufigen Mechanismus zur selektiven Modifikation von Proteinen mittels trans-Proteinspleißen.....	71
4.2.1	Einfluss des Cysteinrestes in der C-terminalen Exteinsequenz des <i>Ssp</i> DnaB Inteins .....	72
4.3	Cysteinmodifikationen des DnaB <sup>C</sup> -Konstruktes & Proteinspleißreaktionen der modifizierten Cys-tag-Proteine .....	73
4.3.1	Cysteinbiokonjugation mit Fluorophoren .....	75
4.3.2	Proteinbiotinylierung durch Cys-tag Modifikation .....	79
4.3.3	Selektive Modifikation von ungereinigten Proteinen in Zelllysaten.....	81
4.3.4	Regioselektive Modifikation von Cystein-haltigen Proteinen .....	83
4.4	Herstellung und Charakterisierung des neuen gespaltenen <i>Mxe</i> GyrA .....	
	<b>Inteins</b> .....	<b>89</b>
4.4.1	Einfluss des Cys-tags auf die Spleißaktivität des GyrA Inteins.....	93
4.4.2	Fluorophor-Modifikation und Spleißreaktion des GyrA <sup>C</sup> -Cys-tag Proteins....	99
4.4.3	PEGylierung des GyrA <sup>C</sup> -Cys-tag-Proteins.....	101
4.4.4	Modifikation von Cystein-reichen Proteinen .....	103
4.4.4.1	<i>Modifikation des menschlichen Wachstumshormons (hGH)</i> .....	103
4.4.4.2	<i>Modifikation einer nicht-ribosomalen Peptidsynthetase</i> .....	107
4.4.5	Orthogonalität der beiden gespaltenen Inteine.....	111

<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>113</b>
5.1	Generierung von künstlich gespaltenen Inteinen.....	113
5.2	Vergleich der Ladungsverteilung der einzelnen Inteinfragmente.....	116
5.3	Bildung des verzweigten Intermediates.....	118
5.4	Cys-tag Modifikation: Eine neue Methode zur regio- und chemoselektiven..... Modifikation von Proteinen.....	120
5.4.1	Chemoselektivität der Reaktion und verwendbare Reagenzien.....	121
5.4.2	Regioselektivität der Reaktion .....	122
5.4.3	Weitere Eigenschaften der Reaktion .....	123
5.4.4	Flexibilität der Methode .....	126
5.4.5	Ausbeute der Modifikationsreaktionen .....	128
5.4.6	Ausbeute der Spleißreaktionen.....	130
5.5	Ausblick.....	131
<b>6</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>134</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>143</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>149</b>

## Abkürzungen

<b>5-IAF</b>	5-Iodacetamidfluorescein	<b>Int<sup>C</sup>/Int<sup>N</sup></b>	C- und N-terminales Inteinfragment
<b>aa</b>	Aminosäure	<b>IPTG</b>	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
<b>ACP</b>	Acyl-Carrier-Protein	<b>LB-Medium</b>	Luria-Bertani Medium
<b>AF</b>	Alexa Fluor C5 Maleinimid	<b>m/v</b>	Masse/Volumen
<b>Amp<sup>n</sup></b>	Ampicillin (n µg/mL)	<b>MALDI-TOF</b>	Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight
<b>ATP</b>	Adenosin-5'-Triphosphat	<b>MBP</b>	Maltose-bindendes Protein
<b>Bla</b>	β-Laktamase	<b>MCS</b>	Multiple cloning site
<b>BM</b>	EZ-Link Maleinimid-PEG2-Biotin	<b>NRPS</b>	Nicht-ribosomale Peptidsynthetase
<b>bp</b>	Basenpaar	<b>NTA</b>	Nitrilo-Triessigsäure
<b>CoA</b>	Coenzym A	<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>Cys-tag</b>	Cystein-tag	<b>ori</b>	Replikationsursprung
<b>Da</b>	Dalton	<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>DKP</b>	Diketopiperazin	<b>PCP</b>	Peptidyl-Carrier-Protein
<b>DMF</b>	N,N-Dimethylformamid	<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>DnaB<sup>C</sup>/DnaB<sup>N</sup></b>	C- und N-terminales <i>Ssp</i> DnaB Inteinfragment	<b>PEG</b>	Polyethylenglykol
<b>DTT</b>	Dithiothreitol	<b>PEG5000</b>	Polyethylenglykol-5000-Maleinimid
<b>ESI-MS</b>	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie	<b>Ppant</b>	4'-Phosphopantethein
<b>FKBP</b>	FK506 bindendes Protein	<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>FM</b>	Fluorescein-5-Maleinimid	<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>FPLC</b>	Schnelle Flüssigkeitschromatographie	<b>SDS</b>	Natrium-Dodecylsulfat
<b>FRB</b>	FKBP-Rapamycin-bindende Domäne	<b>SPPS</b>	Peptidfestphasensynthese
<b>gpD</b>	Kopfprotein des λ-Bakteriophagen	<b>Strep</b>	Strep-tag II

<b>GyrA<sup>C</sup>/GyrA<sup>N</sup></b>	C- und N-terminales <i>Mxe</i> GyrA Inteinfragment	<b>TCEP</b>	Tris(2-carboxyethyl)-Phosphin
<b>Hepes</b>	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure	<b>TFA</b>	Trifluoressigsäure
<b>hGH</b>	Menschliches Wachstumshormon	<b>TR</b>	Texas Red C2 Maleinimid
<b>His<sub>6</sub></b>	Hexahistidin-tag	<b>Tris</b>	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
<b>HPLC</b>	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie	<b>Trx</b>	Thioredoxin
<b>HRP</b>	Horseradish-Peroxidase	<b>TycA</b>	Tyrocidin Synthetase A



Proteinogene Aminosäuren mit Abkürzungen und relativen Molmassen:

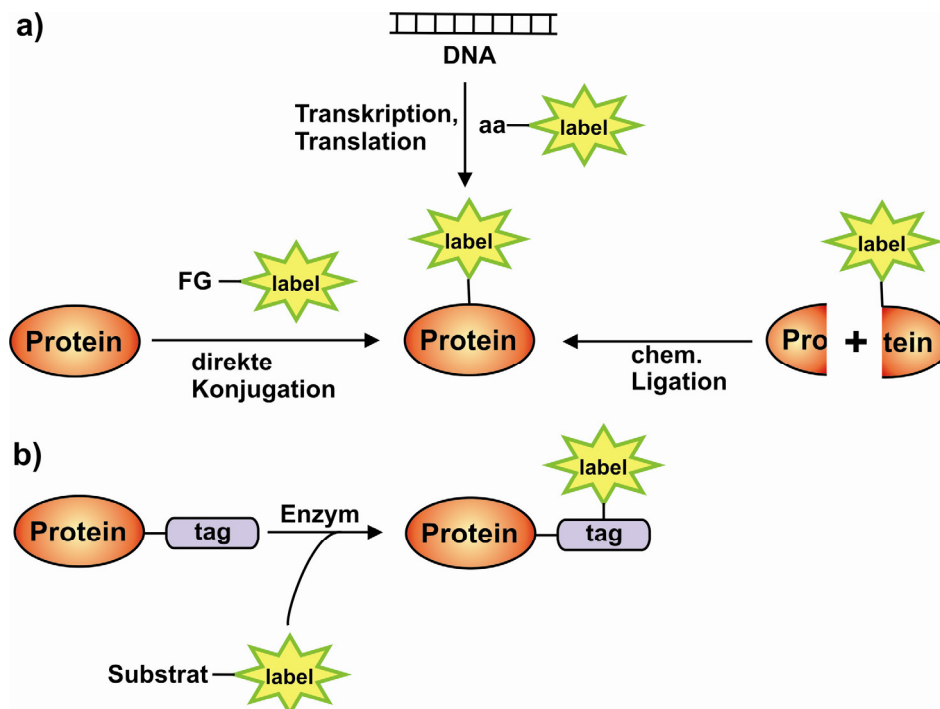
Aminosäure	3-Buchstabencode	1-Buchstabencode	Molekulargewicht [g/mol]
Alanin	Ala	A	89
Arginin	Arg	R	174
Asparagin	Asn	N	132
Aspartat	Asp	D	133
Cystein	Cys	C	121
Glutamin	Gln	Q	146
Glutamat	Glu	E	146
Glycin	Gly	G	75
Histidin	His	H	155
Isoleucin	Ile	I	131
Leucin	Leu	L	131
Lysin	Lys	K	146
Methionin	Met	M	149
Phenylalanin	Phe	F	165
Prolin	Pro	P	115
Serin	Ser	S	105
Threonin	Thr	T	119
Tryptophan	Trp	W	204
Tyrosin	Tyr	Y	181
Valin	Val	V	117

# 1 Einleitung

Proteine stellen als zentraler Bestandteil von biologischen Systemen einen Hauptaspekt biochemischer Forschung dar. Aufgrund der außerordentlich großen Vielfalt und Komplexität von natürlichen Systemen, ist eine erfolgreiche Identifizierung und Charakterisierung eines einzelnen oder einiger weniger Bestandteile ausschlaggebend für das Verständnis biologischer oder biochemischer Prozesse. Ist man beispielsweise an der Struktur, Funktion, Dynamik, Lokalisation und Interaktionsanalyse eines bestimmten Proteins interessiert, so gibt es zahlreiche biophysikalische Methoden mit denen einzelne Fragestellungen beantwortet werden können. Die meisten dieser Methoden erfordern jedoch das gezielte Einbringen einer biophysikalischen Sonde, ohne dass dabei das Protein selbst oder dessen Umfeld stark beeinträchtigt wird [1]. Hierbei kann die biophysikalische Sonde entweder direkt über eine chemische Reaktion durch eine kovalente Bindung mit dem Zielprotein verbunden werden (Biokonjugation [2]) oder die Knüpfung erfolgt über einen genetisch kodierten Fusions-tag. Dabei stellt die Selektivität und Spezifität mit der die Reportergruppe oder Sonde mit einem Zielprotein verbunden wird, die größte Herausforderung dar und ist unabhängig von der jeweiligen Anwendung ausschlaggebend für ein erfolgreiches Experiment [3].

Beispielsweise kann die Lokalisation eines bestimmten Proteins innerhalb einer Zelle durch zumeist fluoreszierende Sonden und deren spezifische Detektion bestimmt werden. Besonders hervorzuheben ist hierbei das gezielte Herstellen von Fusionsproteinen, wobei insbesondere Fusionen mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP)[4] zur Lokalisation von Proteinen, oder zur Aufklärung von Transportwegen innerhalb einer Zelle oder eines ganzen Organismus beigetragen haben [5]. Proteininteraktionen können z.B. durch fluoreszenzspektroskopische Methoden wie FRET-Messungen [6] (engl. fluorescence resonance energy transfer) analysiert werden. Dies bedingt jedoch die gezielte Positionierung zweier unterschiedlicher Fluorophore innerhalb eines oder mehrerer Proteine. Weitere wichtige Anwendungen von Modifikationsreaktionen sind das Einbringen von Affinitätsmarkern zur Reinigung, die segmentelle Isotopenmarkierung für NMR-Studien zu Konformationsänderungen oder Subdomänenbewegungen, von quervernetzenden Einheiten für Interaktionsstudien, von Polymereinheiten für pharmakologische Zwecke oder das Anhängen an feste Phasen. Diese ganzen Funktionalitäten erfordern allerdings auch entsprechende chemische Reaktionen, damit diese Reportergruppen regio- und chemoselektiv mit dem Zielprotein verbunden werden können.

Im Laufe der Jahre wurden zahlreiche Methoden zur selektiven Modifikation von Proteinen mit biophysikalischen Sonden entwickelt. Dazu wurden verschiedenartige Ansätze gewählt, wie z.B. die direkte Biokonjugation von bestimmten Aminosäuren innerhalb eines Proteins mit den entsprechend funktionalisierten Sonden oder die Erweiterung des genetischen Codes [7, 8] durch tRNA Suppressortechniken. Auch das gezielte Anbringen einer kurzen Peptid- oder Proteinsequenz (tag) zur enzymkatalysierten Proteinmodifikation, sowie das Zusammensetzen eines Proteins aus einzelnen Peptidfragmenten durch Ligationstechniken, wie der nativen chemischen Ligation (NCL) [9] oder EPL [10] (engl. Expressed protein ligation) sind häufig verwendete Methoden. Diese grundsätzlichen, oben genannten Möglichkeiten, ein Protein zu modifizieren, sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt.



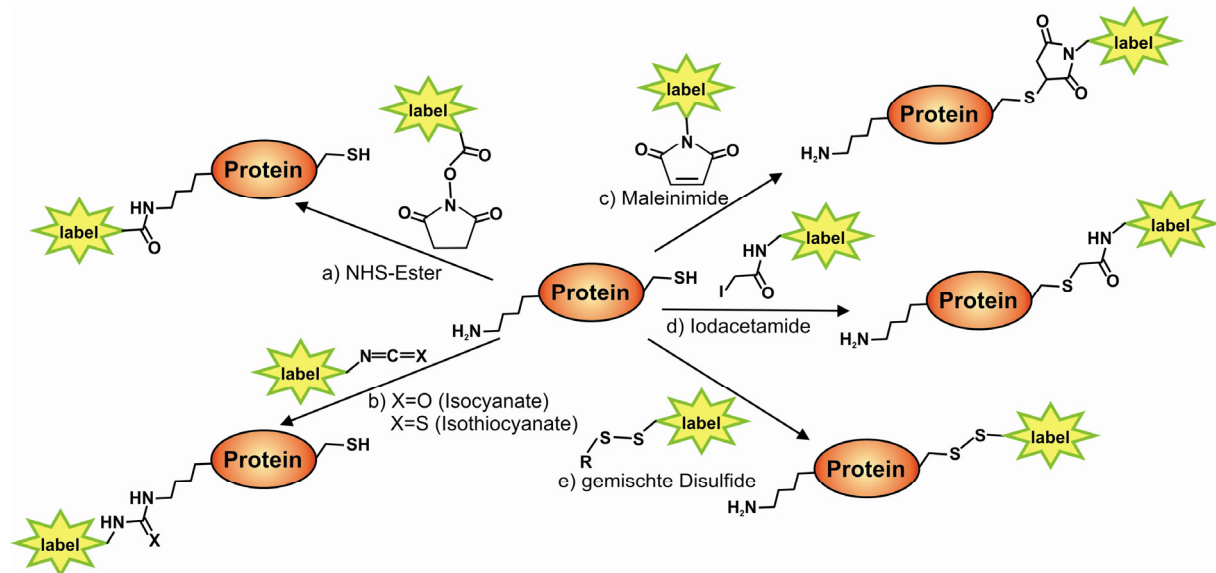
**Abbildung 1: Methoden zur Herstellung chemisch modifizierter Proteine.** a) Direktes Einbringen einer biophysikalischen Sonde (label) kann durch direkte Biokonjugation von bestimmten Aminosäuren, durch tRNA-Suppressortechniken oder durch den Zusammenbau aus Peptidbausteinen mittels chemischer Ligationstechniken erfolgen. b) Auch durch Fusion des Zielproteins mit einer Peptid- oder Proteinsequenz (tag) und anschließender enzymatischer oder nicht-enzymatischer Reaktion können modifizierte Proteine generiert werden. (FG = funktionelle Gruppe)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Methode entwickelt, die das selektive Modifizieren eines Proteins mit Hilfsproteinen, den so genannten gespaltenen Inteinen, bewirkt. Zur Übersicht sind nachfolgend die bekanntesten und zugleich auch am weitesten verbreiteten Methoden, mit denen modifizierte Protein hergestellt werden können, beschrieben.

## 1.1 Direkte Konjugation von Aminosäuren mit funktionalisierten Sonden

Historisch gesehen stellt die direkte Modifikation von Aminosäuren mit verschiedenartigen chemischen Gruppen den am häufigsten verwendeten und wohl auch experimentell einfachsten Weg zur Herstellung modifizierter Proteine dar. Der Vorteil dieser Methode liegt sicherlich in der Fülle an zur Verfügung stehenden Reagenzien; ein schwerwiegender Nachteil ergibt sich allerdings aus der Tatsache, dass die Reaktion nur dann chemoselektiv verläuft, wenn die funktionelle Gruppe selektiv mit nur einer bestimmten Aminosäure reagiert. Außerdem ist die Reaktion nur dann auch streng regioselektiv, wenn die adressierte Aminosäure nur einmal im Protein vorhanden ist.

Abgesehen von einigen wenigen aliphatischen Aminosäuren (Gly, Ala, Leu, Ile, Pro, Val, Phe) können alle anderen proteinogenen Aminosäuren chemisch modifiziert werden. Allerdings unterscheiden sich die Reaktionsbedingungen und die Selektivitäten der einzelnen Reaktionen merklich voneinander. Während es für Lysin- und Cysteinseitenketten zahlreiche recht spezifische Reagenzien gibt, nimmt die Anzahl und Selektivität der Reagenzien für die anderen Aminosäuren deutlich ab. Die wichtigsten Reaktionen, um die Aminogruppe von Lysinen, bzw. die Thiolgruppe von Cysteinen zu modifizieren sind in Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2: Direkte Biokonjugation von Lysin- und Cysteinseitenketten.** Lysine können selektiv mit N-Hydroxysuccinimidestern (a) oder Iso(thio-)cyanaten (b) modifiziert werden. Cysteine reagieren hingegen mit Maleinimiden (c), Halogenacetamiden, wie z.B. Iodacetamiden (d) oder aber gemischten Disulfiden (e).

Aminogruppen von Proteinen werden z.B. zumeist durch acylierende Reagenzien modifiziert. Dabei entstehen je nach Reagenz Amidbindungen, Carbamate und Thiocarbamate, Sulfonamide oder auch Thioharnstoffderivate. Die Vielzahl an selektiven Reagenzien ergibt sich aus der Tatsache, dass fast alle Proteine nukleophile Lysinseitenketten und die meisten

auch einen freien N-Terminus besitzen. Dabei ist die Reaktivität der Aminogruppe stark vom pH-Wert abhängig. Die  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysinresten sind mäßig basisch ( $pK_a \approx 10,5$ ) und dementsprechend reaktiv gegenüber den meisten acylierenden Reagenzien. Jedoch ist die Konzentration an freier Base bei pH-Werten unter pH 8,0 ziemlich gering, d.h. die Reaktion verläuft dementsprechend langsam. pH-Werte von 8,5-9,5 sind gewöhnlich optimal für eine Acylierungsreaktion von Aminen mit z.B. Isothiocyanaten oder Succinimidestern. Die  $\alpha$ -Aminogruppe des freien N-Terminus eines Proteins hat normalerweise einen  $pK_a$ -Wert von ca. 7,0 und kann deshalb am besten bei neutralem pH-Wert modifiziert werden. Besonders geeignet sind aktivierte Ester wie z.B. der N-Hydroxysuccinimidester (NHS-Ester), die selektiv gegenüber aliphatischen Aminen und fast keine Reaktivität zu Alkoholen, Phenolen (Tyrosin) und Histidinen besitzen und dabei eine stabile Amidbindung ausbilden (Abb. 2a). Sulfonylechloride sind im Vergleich dazu deutlich instabiler und unspezifischer, da sie auch mit Phenolen (wie Tyrosin), aliphatischen Alkoholen, Thiolen und Imidazolen reagieren können. Isocyanate (R-NCO) und Isothiocyanate (R-NCS) können ebenso eingesetzt werden und bilden (Thio)-harnstoffprodukte (Abb. 2b), wobei Isothiocyanate die wesentlich instabileren Isocyanate inzwischen fast vollständig verdrängt haben [11].

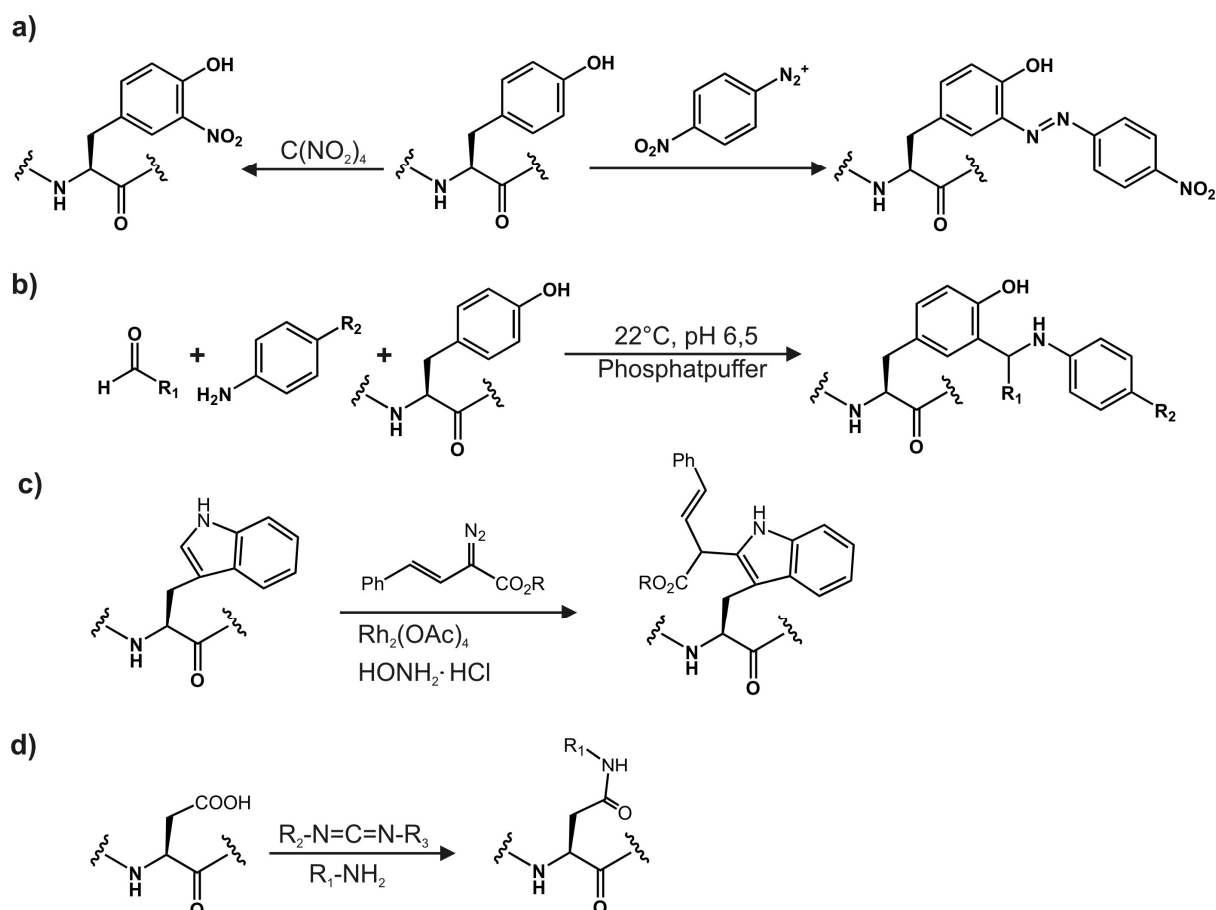
Auch die freie Thiolgruppe von Cysteinen bietet die Möglichkeit, ein Protein selektiv zu modifizieren. Die entsprechenden Thiol-reaktiven funktionellen Gruppen sind primär alkylierende Stoffe, wie Alkyl- und Arylhalogenide, sowie Maleinimide (Abb. 2c), Halogenacetamide (Abb. 2d) und gemischte Disulfide (Abb. 2e). Diese reagieren in der Regel bei Raumtemperatur oder darunter und einem pH-Bereich von 6,5-8,0 unter Ausbildung einer stabilen Thioetherbindung, bzw. zum entsprechenden Disulfid [2]. Alkylhalogenide haben den Nachteil, dass sie in Abwesenheit von Cysteinen auch mit Methionin, Tyrosin oder Histidin reagieren können. Diese Probleme treten bei Reaktionen mit den selektiveren Maleinimiden nicht auf. Dabei fungiert die Maleinimidgruppe als Michael-Akzeptor und wird von einem Thiolat-Anion nukleophil angegriffen, wodurch sich in einer Additionsreaktion das entsprechende Thioetherprodukt bildet. Hierbei kann es jedoch bei höheren pH-Werten verstärkt zur Hydrolyse des Maleinimidringes oder durch Aminolyse mit anderen Aminogruppen des Proteins zu quervernetzten Produkten kommen. Sind die Cysteinseitenketten in einem bestimmten Protein als Disulfidbrücken miteinander verbunden, so müssen diese vorher mit Reduktionsmitteln wie Dithiothreitol (DTT),  $\beta$ -Mercaptoethanol oder Tris-(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) zum freien Thiol reduziert werden [11].

Im Gegensatz zu den zahlreichen Möglichkeiten, die Seitenketten von Lysinen und Cysteinen selektiv zu modifizieren, gibt es für die anderen Aminosäuren nur eine sehr

begrenzte Anzahl an selektiven Biokonjugationsreaktionen. Einige gängige Reaktionen um beispielsweise Tyrosine, Tryptophane und negativ-geladene Aminosäuren wie Aspartat und Glutamat chemisch zu modifizieren sind in Abbildung 3 gezeigt.

Obwohl Alkohole wie Ser, Thr und Tyr in Proteinen recht häufig vorkommen, ist ihre chemische Reaktivität in wässriger Lösung extrem gering. Deshalb gibt es auch kaum Reagenzien die selektiv mit diesen Aminosäuren reagieren, insbesondere in Gegenwart der wesentlich reaktiveren Thiol- und Amin-Nukleophile [12]. Eine Möglichkeit besteht darin, N-terminale Serin- oder Threoninseitenketten mit Periodat zu Aldehyden zu oxidieren [13], die ihrerseits dann mit Hydrazin-, Hydroxylamin- oder Aminderivaten reagieren können.

Auch für die Modifikation von Tyrosinresten gibt es eine zunehmende Anzahl an Strategien [12]. Hierzu zählt in erster Linie die elektrophile aromatische Substitution, wodurch Tyrosine gezielt iodiert, nitriert oder über eine Azobindung [14] modifiziert werden. Hierbei stellen die Reaktionen mit Tetranitromethan oder mit einem aus einem Anilinderivat hergestelltem Diazoniumsalz [15] (Abb. 3a) die generellsten Methoden dar, um neue funktionelle Gruppen in Tyrosinreste einzuführen. Erwähnenswert ist zudem eine recht neue Drei-Komponenten-Reaktion des Mannich-Typs [16] (Abb. 3b), bei der zunächst *in situ* aus Formaldehyd und einem Anilinderivat ein Imin entsteht, welches spontan mit der Phenolseitenkette eines Tyrosins in einer elektrophilen aromatischen Substitutionsreaktion weiterreagiert. Diese Reaktion ist zudem sehr selektiv, da weder Thiol- noch Aminogruppen diese Art der Reaktion eingehen.



**Abbildung 3: Funktionalisierung von Tyrosin-, Tryptophan- und Aspartat- bzw. Glutamatseitenketten.** a) Elektrophile aromatische Substitution von Tyrosinresten durch Tetranitromethan oder Diazoniumsalzen. b) Drei-Komponenten-Reaktion des Mannich-Typs von Tyrosinresten. c) Tryptophanmodifikation durch *in situ* gebildete Rhodiumcarbenoide. d) Aktivierung von Carboxylatresten von Aspartat und Glutamat mit Carbodiimiden und anschließender Reaktion mit Aminen.

Tyrosine können ferner über eine Palladium-katalysierte Alkylierung zu Allylbenzylethern umgewandelt werden [17]. Auch Tryptophane stellen aufgrund ihres relativ geringen natürlichen Vorkommens ein potentiell Ziel für selektive chemische Modifikationsreaktionen dar [12]. Dabei werden in der Regel Übergangsmetallreaktionen verwendet, bei denen intermediär ein Übergangsmetallcarbenoid gebildet wird [18]. Eine solche Reaktion ist in Abb. 3c) zu sehen [19]. Hierbei entsteht aus einer Vinyldiazoverbindung und  $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$  in wässriger Lösung zunächst ein elektrophiles Rhodiumcarbenoidintermediat, welches mit der Indolseitenkette von Tryptophanen zu N- bzw. 2-alkylierten Indolen reagiert. Für die Reaktion ist zudem Hydroxylamin Hydrochlorid essentiell. In Gegenwart von Wasser kann das reaktive Carbenoid auch langsam zum Alkohol hydrolysieren.

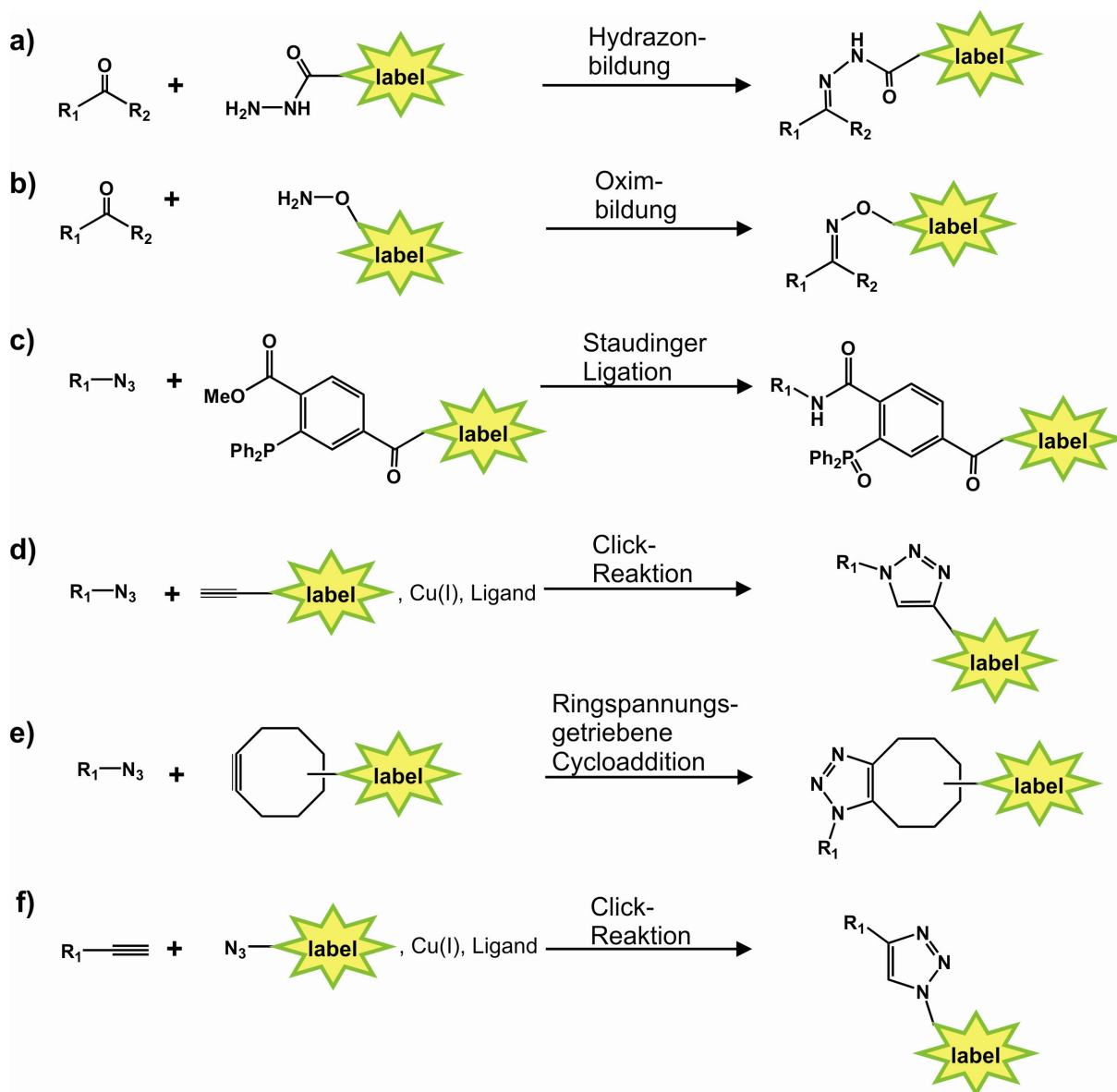
Auch Carboxylatreste von Aspartat- und Glutamatseitenketten lassen sich funktionalisieren. Dazu bedient man sich zumeist wasserlöslicher Carbodiimide, wodurch Aktivester entstehen, die ihrerseits dann mit Aminen unter Knüpfung einer Amidbindung

reagieren (Abb. 3d). Die Bildung von N-Acylharnstoff-Nebenprodukten kann außerdem durch Zugabe von nukleophilen Katalysatoren wie Hydroxybenzotriazol (HOBT) unterdrückt werden.

## 1.2 Einführung von funktionellen Gruppen für bio-orthogonale Reaktionen

Zusätzlich zu den Funktionalitäten, die durch natürliche Aminosäuren abgedeckt werden, gibt es noch eine Vielzahl an funktionellen Gruppen, die selektive chemische Reaktionen eingehen können, aber nicht natürlich vorkommen. Bringt man beispielsweise Alkin-, Azid-, Aldehyd- oder Keto-Funktionalitäten in ein Protein ein, so gibt es eine Vielzahl an selektiven Reaktionsmöglichkeiten, die diese Reportergruppen eingehen können, um eine biophysikalische Sonde einzuführen. Zu den prominentesten der so genannten bio-orthogonalen Reaktionen gehören z.B. die Click-Reaktion, die Staudinger Ligation, die durch Ringspannung getriebene Cycloaddition, sowie die Bildung von Hydrazonen und Oximen [20-23]. Beispiele für diese verschiedenen Reaktionen sind in Abbildung 4 dargestellt. Keto- oder Aldehydgruppen reagieren mit Hydrazinen unter Wasserabspaltung zu Hydrazonen (Abb. 4a) und mit Hydroxylaminen zu Oximen (Abb. 4b). Azide und Alkine reagieren in einer kupferkatalysierten Variante der Huisgen 1,3 dipolaren Cycloaddition (Click-Reaktion) unter Ausbildung von Triazolprodukten (Abb. 4d, 4f). Da für diese Art der Reaktion Cu(I) notwendig ist, welches cytotoxische Eigenschaften besitzt, wurden mildere Methoden entwickelt, um Azide selektiv zu modifizieren. Besonders geeignet ist dafür zum einen die Staudinger Ligation [24], bei der aus einem Azid und einem Triarylphosphin zunächst ein Iminophosphoran entsteht. Nach der intramolekularen Zyklisierung des Aza-Ylids, bildet sich durch Hydrolyse mit Wasser schließlich die Amidbindung zur Reportergruppe und das oxidierte Phosphin aus. Diese Reaktion ist in Abb. 4c) abgebildet. Auch die metall-freie [3+2] Cycloaddition mit Cyclooctinderivaten (Abb. 4e) stellt eine attraktive Alternative dar [23]. Hierbei ist das Nachlassen der Ringspannung des Cyclooctinrings die treibende Kraft der Reaktion, wodurch Azide schon bei Raumtemperatur reagieren können. Da die Reaktion außerdem ohne toxische Kupferionen auskommt, konnte sie auch für die Modifikation von Proteinen auf Zelloberflächen und in lebenden Zellen verwendet werden.

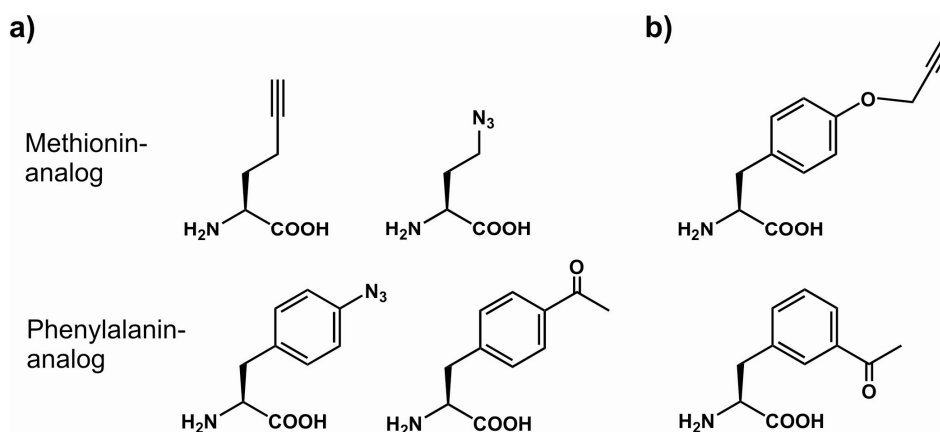




**Abbildung 4: Bio-orthogonale Reaktionen.** Ketone und Aldehyde ( $R_2=H$ ) reagieren mit Hydrazinen zu Hydrazonen (a) und mit Hydroxylaminen zu Oximen (b). Azide können mit einem Triarylphosphan selektiv eine Staudinger Ligation eingehen (c) oder in einer Ringspannungs-getriebenen [3+2] Cycloaddition mit Cyclooctinderivaten reagieren (e). Aus Azidreportergruppen und Alkinmarkern (d), sowie aus Alkinreportergruppen und Azidmarkern (f) bilden sich in einer kupferkatalysierten 1,3 dipolaren Cycloaddition (Click-Reaktion) Triazole.

Da diese Funktionalitäten in den natürlichen Aminosäuren nicht vorkommen und deshalb auch nicht über einfache molekularbiologische Methoden eingeführt werden können, muss dies über andere Wege geschehen. Dazu gibt es grundsätzlich zwei Möglichkeiten dies über den Translationsapparat der Zelle zu bewerkstelligen, nämlich entweder über einen Seitenketten- [25] oder einen orts-spezifischen Weg [7]. Für den ersteren Fall macht man sich auxotrophe Bakterienstämme zunutze. In Abwesenheit einer bestimmten natürlichen Aminosäure ist es nun möglich, ein unnatürliches, jedoch stark analoges Derivat davon, zuzugeben, welches dann in das Protein anstelle der natürlichen Aminosäure eingebaut wird. Beispielsweise konnte ein Phenylalanin-auxotropher Stamm dazu genutzt werden, statt aller

natürlichen Phenylalanine die Derivate *p*-Azidophenylalanin, bzw. *p*-Acetylphenylalanin (Abb. 5a) in die Proteine einzubauen [26, 27]. Und mithilfe eines Methionin-auxotrophen Stammes konnten Proteine generiert werden, die Homopropargylglycin, bzw. Azidohomoalanin anstelle des natürlichen Methionins besaßen [24, 28]. Eine andere Methode, die von Schultz und Mitarbeitern entwickelt wurde, bedient sich der so genannten nonsense-Suppressions-Technik. Hierfür wird ein selektives tRNA/Aminoacyl-tRNA-Synthetase Paar für die selektive Aktivierung einer bestimmten unnatürlichen Aminosäure durch Proteinevolutionstechniken entwickelt. Es wird dafür ein tRNA-Anticodon verwendet, das komplementär zu einem seltenen Stopp-Codon ist und seinerseits in die entsprechende DNA eingebracht wird, nämlich genau an den Stellen, an denen die unnatürliche Aminosäure im Protein vorkommen soll. Inzwischen gibt es ein ganzes Arsenal an unnatürlichen Aminosäuren die auf diesem Wege in Proteine von *E. coli* und Hefe eingebracht werden konnten [29-31]. Als Beispiel soll hier nur kurz der Einbau von *m*-Acetylphenylalanin in das *E. coli* Membranprotein LamB [32] und der Einbau eines Tyrosinanalogs mit Azidofunktionalität (Abb. 5b) und anschließender kupferkatalysierten [3+2] Cycloaddition erwähnt werden [29].



**Abbildung 5: Einbau von unnatürlichen Aminosäuren.** a) Methionin-auxotrophe Stämme wurden benutzt um Homopropargylglycin, bzw. Azidohomoalanin anstelle des natürlichen Methionins einzubauen und ein Phenylalanin-auxotropher Stamm wurde für den Einbau von *p*-Azidophenylalanin, bzw. *p*-Acetylphenylalanin verwendet. b) Durch die nonsense-Suppressionstechnik konnte eine Vielzahl an unnatürlichen Aminosäuren in Proteine eingebaut werden, u.a. auch das gezeigte *m*-Acetylphenylalanin und ein Tyrosinanalogs mit Azidofunktionalität.

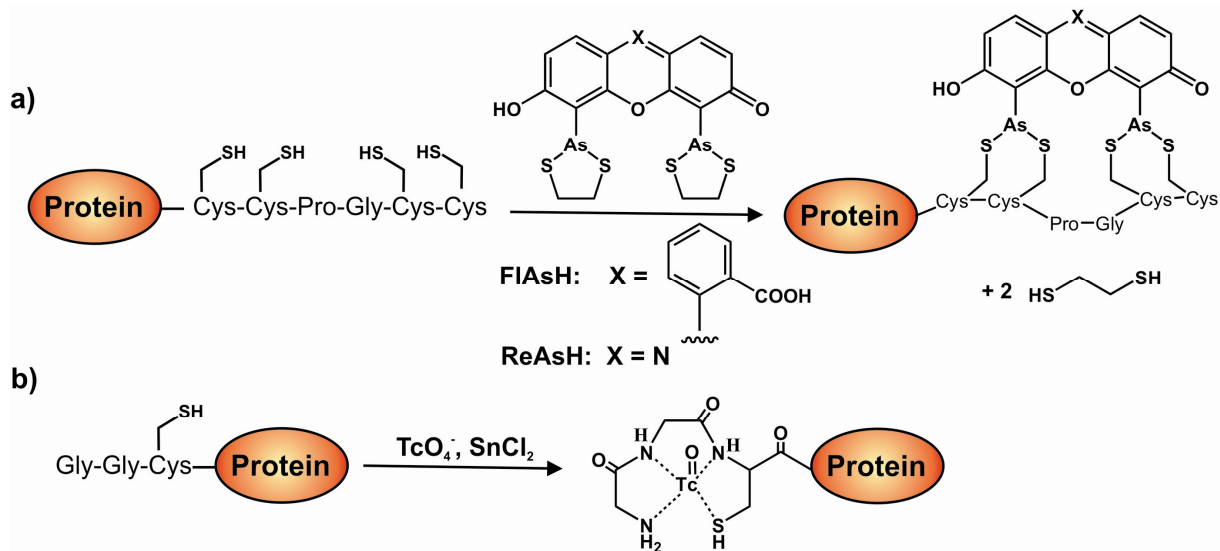
### 1.3 Fusionsproteine

Eine grundsätzlich andere Möglichkeit ein Zielprotein zu modifizieren, besteht darin, dass zu untersuchende Protein auf DNA-Ebene mit einer zusätzlichen Peptidsequenz (tag) zu fusionieren und anschließend das für das gesamte Fusionsprotein kodierende Gen zu exprimieren. Durch diesen zusätzlichen, nicht natürlichen Peptidzusatz können nun optische oder biophysikalische Sonden an das Protein geknüpft werden. Dies erfolgt zumeist über enzymatische Katalyse, wobei die zusätzliche Peptidsequenz ein Erkennungsmotiv für ein spezifisches Enzym darstellt. Andere Methoden nutzen den Peptidzusatz, um mithilfe des Chelat-Effektes das gewünschte Markermolekül zu binden. Außerdem kann die Peptidsequenz nicht nur die Erkennungssequenz für ein Enzym darstellen, sondern vielmehr ein funktionelles Protein, welches sich selbst mit einem Substrat modifiziert. Bei all diesen Techniken ist grundsätzlich die Größe der angehängten Peptidsequenz (des tags) entscheidend, da diese evtl. die Struktur und/oder Funktion des Zielproteins merklich beeinflussen kann. Ein großes Fusionsprotein kann daher einen viel größeren Einfluss auf die Eigenschaften des zu untersuchenden Proteins haben, als eine kurze Peptidsequenz. Im Folgenden sollen einige der wichtigsten Peptid- und Proteintags vorgestellt werden.

#### 1.3.1 FIAsh, ReAsH & andere Chelator-tags

Eine nicht-enzymatische Erkennung und Modifikation eines Proteins basiert auf der Affinität eines an das Zielprotein fusionierten Tetracysteinmotivs zu einer Bisarsenverbindung. Hierbei wird entweder das Fluoresceinderivat (FIAsh) oder das Resorufinderivat (ReAsH) der Bisarsenverbindung unter Abspaltung seiner zwei Ethandithiolliganden kovalent an das Tetracysteinmotiv Cys-Cys-Xaa-Xaa-Cys-Cys gebunden (Abb. 6a) [33-35].

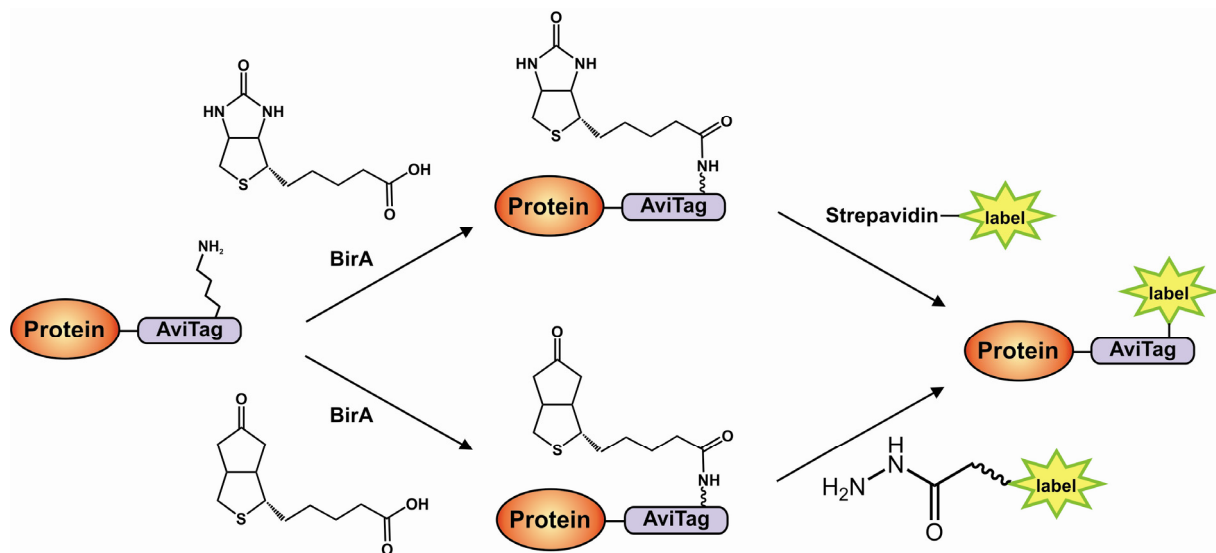
Ein ähnlicher Effekt wird ausgenutzt um Proteine radioaktiv mit  $^{99m}\text{Tc}$  zu markieren. Hierfür werden kurze Cystein- und Glycin-reiche Aminosäuresequenzen an ein Protein gehängt, die ihrerseits dann zur Ausbildung eines stabilen  $[\text{TcO}]^{3+}$  Komplexes durch Koordination der N- und S-Atome beitragen (Abb. 6b) [36]. Dieser durch den Chelat-Effekt thermodynamisch sehr stabile Komplex, der durch Reduktion mit  $\text{SnCl}_2$  entsteht, konnte schon in zahlreichen Fällen zur radioaktiven Markierung von Proteinen *in vitro* und *in vivo* eingesetzt werden [37-39].



**Abbildung 6: Proteinmodifikation mithilfe des Chelat-Effektes.** Durch die Bindung von Derivaten einer Bisarsenverbindung an eine Tetracysteinensequenz können Proteine modifiziert werden (a). Auch radioaktive Markierungen mit <sup>99m</sup>Tc können über kurze Glycin- und Cystein-reiche Sequenzen unter Ausbildung stabiler [TcO]<sup>3+</sup>-Komplexe eingebracht werden (b).

### 1.3.2 Biotin Holoenzym Synthetase BirA

Die Biotinylierung von Proteinen ist wegen der hohen Affinität und Spezifität der Biotin-Avidin Interaktion für zahlreiche molekularbiologische und biomedizinische Anwendungen von Bedeutung. Daraus entstand das Bestreben eine Methode zu entwickeln, die eine Proteinbiotinylierung sowohl *in vitro*, als auch in der lebenden Zelle ermöglicht. Zu diesem Zweck ging man von einer Klasse von Enzymen, den so genannten Biotin-abhängigen Carboxylasen, aus. An diese Enzyme wird post-translational eine Biotingruppe kovalent über eine Amidbindung an eine Lysinseitenkette gehängt. Diese zweistufige und ATP-abhängige Reaktion wird durch eine weitere Klasse von Enzymen, den Biotin-Holoenzym Synthetasen (BHS) katalysiert. In einem ersten Schritt wird unter ATP-Verbrauch ein aktiviertes Biotinyl-5'-Adenylat gebildet, wobei die Biotingruppe anschließend durch einen nukleophilen Angriff auf die Aminogruppe einer Lysinseitenkette übertragen wird. Ausgehend von der Biotin-Holoenzym-Synthetase BirA aus *E. coli* wurden nun verschiedene Peptidtags entwickelt, die über unterschiedliche Länge und Selektivität verfügen [40]. Als erste funktionstüchtige Domäne diente die 123 Aminosäuren lange PSTCD Domäne der *Propionibacterium shermanii* Transcarboxylase [41]. Ein neueres Ausleseverfahren resultierte in einem Akzeptorpeptid (AP) aus nur noch 23 Aminosäuren, das letztendlich noch auf 15 (GLNDIFEAQKIEWHE, AviTag) bzw. 14 Aminosäuren verkürzt werden konnte [42].



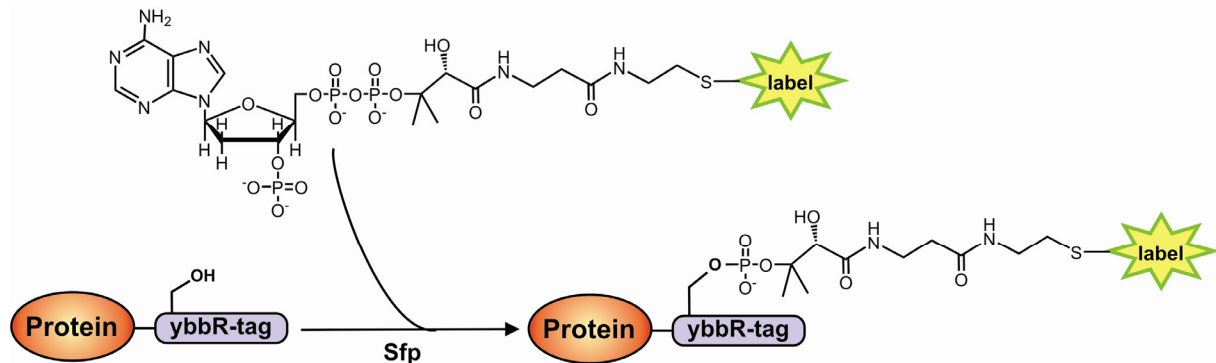
**Abbildung 7: Modifikation von AviTag-Fusionsproteinen mit BirA.** Die AviTag-Sequenz (GLNDIFEAQKIEWH) kann zum einen mit Biotin (oben) oder durch ein Biotinanalogon mit Ketofunktionalität (unten) modifiziert werden. Die biophysikalische Sonde wird dann in einem zweiten Schritt entweder über die Biotin-Avidin-Interaktion oder über ein Hydrazinderivat eingebracht.

Der AviTag konnte in einer Vielzahl von Experimenten erfolgreich für die Biotinylierung eines Zielproteins verwendet werden [43]. Die Einführung einer detektierbaren biophysikalischen Gruppe führt hierbei entweder über die Interaktion von Streptavidin mit Biotin oder über die Reaktion eines Biotinanalogon mit einem Hydrazin- oder Hydroxylamin-derivat [44] und ist in Abbildung 7 gezeigt. Eine relativ neue Erweiterung dieser Methode lieferte ein orthogonales Biotinligase-AP Paar zum parallelen Einbringen zweier biophysikalischer Sonden [45].

### 1.3.3 Proteinmodifikation mit Phosphopantetheintransferasen

Phosphopantetheintransferasen übertragen die 4'-Phosphopantetheingruppe (Ppant-gruppe) von Coenzym A auf einen konservierten Serinrest eines Acyl- oder Peptidylcarrierproteins (ACP bzw. PCP) [46]. Diese sind Bestandteile von Fettsäuresynthetasen, nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen und Polyketidsynthetasen und werden auf diesem Weg von der apo-Form in die aktive holo-Form überführt. Sfp aus dem Biosynthesecluster von Surfactin aus *Bacillus subtilis*, sowie die *E. coli* Phosphopantetheintransferase AcpS aus der Fettsäurebiosynthese können PCP oder ACP Domänen (ca. 80 Aminosäuren), die als Fusionen mit dem N- oder C-Terminus eines Zielproteins hergestellt wurden, post-translational modifizieren [47]. Ein Vorteil ist hierbei die recht große Toleranz in Bezug auf das Substrat, wodurch auch eine Vielzahl an CoA-Derivaten übertragen werden konnte [48]. Auf diese Weise konnten zahlreiche Funktionalitäten wie z.B. Biotin, Fluorophore, Porphyrine, Zucker und Peptide an

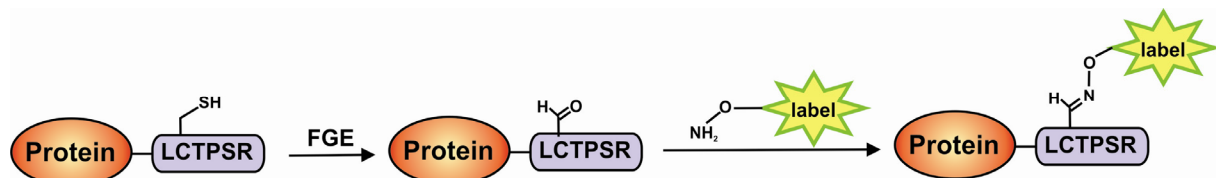
Zielproteine gehängt werden [49, 50]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass es nicht notwendig ist, die gesamte PCP-Domäne als Teil eines Fusionsproteins zu exprimieren. Ein 11 Aminosäuren kurzes Peptid (DSLEFIASKLA, ybbR tag) konnte als effizientes Substrat für die Sfp vermittelte Proteinmodifikation identifiziert werden, das sowohl am N- und C-Terminus, als auch im Inneren eines Proteins eingesetzt werden konnte [51]. Die Sfp katalysierte Modifikationsreaktion eines ybbR-tag-Fusionproteins mit einem modifizierten CoA-Derivat ist in Abbildung 8 abgebildet.



**Abbildung 8: Selektive Markierung von ybbR-tag-Fusionsproteinen mit Sfp.** Sfp erkennt den 11 Aminosäuren kurzen ybbR-tag (DSLEFIASKLA) und katalysiert den Transfer einer modifizierten Ppant-Gruppe auf den Serinrest des ybbR-tags.

### 1.3.4 Aldehyd-tag

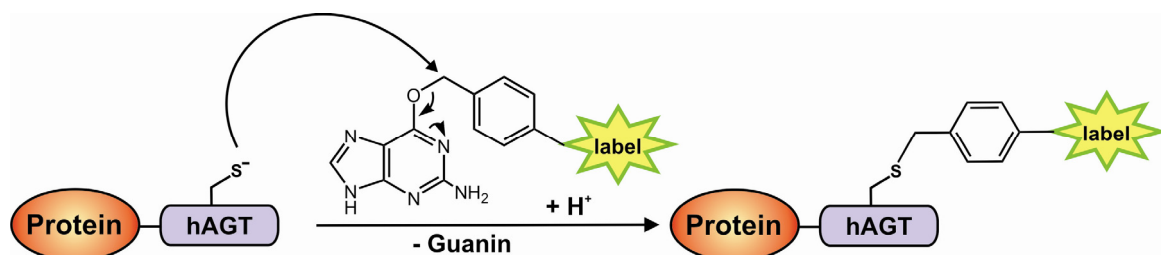
Die Entwicklung des Aldehyd-tags wurde durch die Entdeckung ermöglicht, dass die meisten Sulfatasen einen Aldehyd-tragenden Formylglycinrest in der aktiven Tasche besitzen [52]. Dieser Formylglycinrest entsteht post-translational, durch Oxidation einer konservierten Cysteinseitenkette im Sulfatasemotiv. Katalysiert wird die Reaktion durch Formylglycinbildende Enzyme (FGE, formylglycine generating enzyme), die die Primärsequenz des hoch konservierten CXPXR Motiv erkennen. Carrico *et al.* [53] produzierte in *E. coli* rekombinante Proteine mit entweder einem N- oder C-terminalen Aldehyd-tag. Dabei wurden zum einen der komplette Sulfatase-tag (LCTPSRGSLFTGR, 13 aa) oder ein verkürzter Aldehyd-tag (LCTPSR, 6 aa) verwendet. Diese Konstrukte wurden zusammen mit dem FGE aus *Mycobacterium tuberculosis* co-exprimiert. Auf diese Weise konnten diverse Protein, wie z.B. das Maltose-bindende Protein (MBP), eine Sulfotransferase (Stf0) und das menschliche Wachstumshormon (hGH, engl. human growth hormone) mit Hydroxylamin- oder Hydrazin-funktionalisierten Proben, wie Fluorophoren, Biotin und Polyethylenglykol (PEG) modifiziert werden. Diese Reaktion ist in Abbildung 9 gezeigt.



**Abbildung 9: Proteinmodifikation mithilfe des Aldehyd-tags.** Ausreichend für die enzymatische Erkennung durch Formylglycin-bildende Enzyme (FGE) ist ein 6 Aminosäuren langer Aldehyd-tag (LCTPSR), der das konservierte Sulfatasemotiv CXPXR enthält. Durch Oxidation eines Cysteinrestes entsteht ein Formylglycinrest, welcher dann durch Hydroxylamin- oder Hydrazin-funktionalisierte Proben markiert werden kann.

### 1.3.5 hAGT-Fusionsproteine

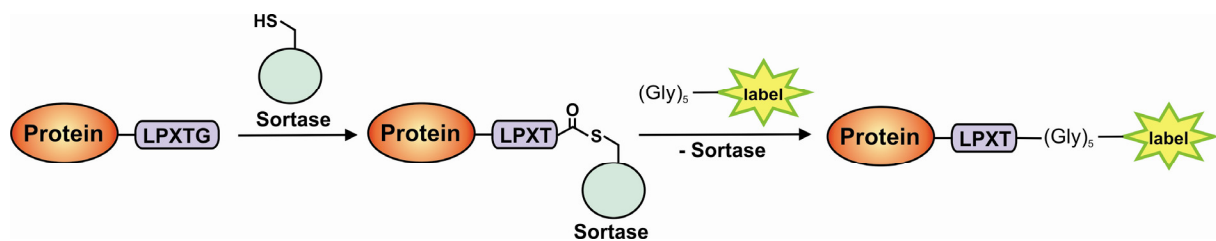
Die menschliche O<sup>6</sup>-Alkylguanine-DNA-Alkyltransferase (hAGT) ist ein 207 Aminosäuren großes Enzym. Ihre physiologische Funktion ist das Entfernen von Alkylgruppen von Guaninbasen der DNA, um die Zelle vor Mutationen zu schützen. O<sup>6</sup>-Alkylguaninaddukte entstehen durch verschiedene alkylierende Reagenzien, wie z.B. Nitrosamine. Diese DNA-Schäden werden repariert, indem hAGT die Alkylgruppe vom O<sup>6</sup>-Alkylguanin irreversibel auf einen eigenen Cysteinrest überträgt. hAGT besitzt keine hohe Substratspezifität und kann deshalb zahlreiche chemische Verbindungen übertragen, wenn diese über eine Benzylgruppe an die Guaninbase gebunden sind. Durch Fusion der 25 kDa großen hAGT mit einem Zielprotein konnten z.B. Fluorescein- oder Biotinderivate von O<sup>6</sup>-Benzylguanin erkannt und über eine stabile Thioetherbindung kovalent gebunden werden (Abb. 10) [54]. Proteinevolutionstechniken resultierten in einer kleineren und besseren hAGT-Variante, dem SNAP-tag, womit Proteine in verschiedenen Organismen wie *E. coli*, Hefe und Säugerzellen modifiziert werden konnten [55-57].



**Abbildung 10: Proteinmodifikation durch hAGT, bzw. SNAP-tag Fusionsproteine.** Ein Zielprotein wird auf DNA-Ebene mit hAGT und der kürzeren Variante dem SNAP-tag fusioniert und exprimiert. In Gegenwart von O<sup>6</sup>-Benzylguaninderivaten wird der modifizierte Benzylrest auf eine hAGT-eigene Cysteinseitenkette transferiert.

### 1.3.6 Sortase-vermittelte Proteinmodifikation

Bakterielle Sortase ist ein Protein, das für die kovalente Verknüpfung von Proteinen mit der bakteriellen Zellwand verantwortlich ist. Die Sortase A aus *Staphylococcus aureus* erkennt z.B. strukturell und funktionell unterschiedliche Substrate anhand eines LPXTG Motivs. Es spaltet die Peptidbindung zwischen Threonin und Glycin, wodurch der N-Terminus zunächst mit der Sortase selbst über ein eigenes Cystein verbunden wird und die Sequenz C-terminal zu Threonin abgespalten wird. Dieses Intermediat wird anschließend über eine Amidbindung an eine Pentaglycinsequenz gebunden. Abbildung 11 zeigt diesen zweistufigen Mechanismus. Da die Sortase relativ tolerant gegenüber der Proteinsequenz N-terminal zum LPXTG-Motiv und der Sequenz C-terminal zum Pentaglycin ist, war es über diesen Mechanismus möglich, diverse Modifikationen wie Fluorophore, Biotin oder quer-vernetzende Einheiten, die an die Pentaglycinsequenz angehängt wurden, in ein Protein einzubringen [58, 59].

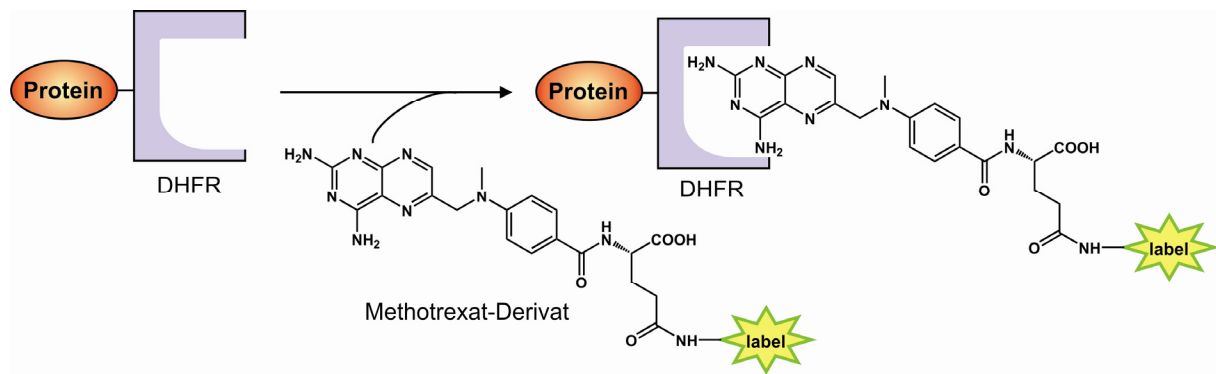


**Abbildung 11: Sortase-vermittelte Proteinmodifikation.** Die Sortase A erkennt ein LPXTG-Motiv und bindet in einem ersten Schritt selbst kovalent über ein eigenes Cystein daran, wobei die Sequenz hinter Threonin abgespalten wird. In einem zweiten Schritt wird die Knüpfung einer Amidbindung zwischen Threonin und einer funktionalisierten Pentaglycinsequenz vermittelt.

### 1.3.7 Proteinmodifikation durch nicht-kovalente Interaktionen

Auch nicht-kovalente Interaktionen können ausgenutzt werden, um Proteine selektiv zu modifizieren. So kann z.B. die nicht-kovalente Interaktion zwischen dem 18 kDa großen Enzym Dehydrofolatreduktase (DHFR) und einem Folsäurederivat, dem Methotrexat für diesen Zweck verwendet werden [60]. Dabei stellt man eine Fusion aus DHFR mit dem Zielprotein her. Die Zugabe eines zumeist zellpermeablen Methotrexat-Derivats führt dann zur selektiven Markierung des Zielproteins. Auf diese Weise war es möglich, Proteine in verschiedenen Kompartimenten der Zelle erfolgreich zu markieren. Eine schematische Darstellung dieser Methode ist in Abbildung 12 zu sehen. Anstelle eines Methotrexat-Derivates ist es ebenso möglich Derivate von Trimethoprim zu verwenden [61, 62], einem Antibiotikum das die Folsäure-Reduktase inhibiert und auch eine hohe Affinität zur DHFR aus *E. coli* aufweist.





**Abbildung 12: Die nicht-kovalente Interaktion zwischen DHFR und einem Methotrexat-Derivat führt zur selektiven Modifikation von Proteinen.** Analog dazu können auch Trimethoprim-Derivate verwendet werden. Eine ganz ähnliche Methode nutzt die Interaktion zwischen FKBP und Derivaten des natürlichen Liganden FK506 aus, um Proteine zu markieren.

Ganz analog kann auch das zur Familie der Immunophilinen gehörende FK506 bindende Protein (FKBP) dazu verwendet werden, um Proteine gezielt chemisch zu modifizieren [63]. Ausgehend von der starken Interaktion zwischen FKBP12 und seinem natürlichen Liganden FK506 wurden zahlreiche Experimente zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen gemacht. Ein Fortschritt wurde durch die Entdeckung eines total-synthetischen Liganden für FKBP12 (SLF, synthetic ligand for FKBP12) erzielt, weil dadurch der immunsuppressive Effekt von FK506 umgangen werden konnte. In einer weiteren Arbeit wurde ein neues Protein-Ligand-Paar gefunden, bei der eine FKBP12-Mutante (F36V) hochaffin an ein SLF-Analogon (SLF') bindet, jedoch nicht an Wildtyp FKBP12 [64]. Dies wurde ausgenutzt um ein Fluorescein-Derivat von SLF' (Fl-SLF') an ein exprimiertes FKBP-Fusionsprotein zu binden. Auf diese Weise konnten u.a. FKBP-Fusionsproteine in lebenden Säugerzellen erfolgreich markiert werden und die subzelluläre Lokalisation von Membranproteinen, die mit FKBP(F36V) fusioniert waren, beobachtet werden.

### 1.3.8 Sonstige Methoden zur Proteinmodifikation mithilfe von Fusionsproteinen

Von den zahlreichen weiteren Möglichkeiten, Proteine durch Generierung geeigneter Fusionsproteine zu modifizieren, soll hier nur noch auf einige wenige Beispiele kurz eingegangen werden. Eine enzymatische Reaktion bedient sich dafür z.B. der sogenannten Proteinfarnesyltransferasen (PFTasen). Diese katalysieren den Transfer eines Farnesylmoleküls auf ein Peptid oder Protein durch kovalente Bindung der Isoprenoideinheit an eine Cysteinseitenkette eines C-terminalen CVIA-Motivs. Die Tolerierung verschiedener

Funktionalitäten am Farnesylmolekül durch die PFTase ermöglicht das selektive Einbringen von verschiedenen Reportergruppen in ein Zielprotein [65]. In verschiedenen Arbeiten konnten auf diese Weise z.B. Azid- oder Alkingruppen in Proteine eingeführt werden, die anschließend über die Click-Reaktion mit verschiedenen biophysikalischen Sonden markiert wurden [66].

Eine andere nicht-enzymatische Methode um Proteine zu modifizieren umfasst die Fusion eines kurzen Tetraaspartat-tags (D4-tag) an ein Zielprotein. Der D4-tag bindet dabei an einen Pyren-beladenen binuklearen Zinkkomplex ( $\text{Zn}^{\text{II}}$ -DpaTyr). Funktionalitäten können dabei über den Zinkkomplex eingebracht werden [67]. Eine Erweiterung davon benutzt eine längere Sequenz, bestehend aus einem Cystein, 6 Alaninen und den 4 Aspartaten (CA6D4-tag) unter der Verwendung eines N- $\alpha$ -Chloroacetyl-Derivates des Zinkkomplexes [68]. Bindet nun der Zinkkomplex an die vier Aspartate, so befindet sich das Cystein des CA6D4-tags in räumlicher Nähe zur  $\alpha$ -Haloketongruppe und kann diese nukleophil angreifen. Durch Substitution wird dadurch der Zinkkomplex mit der Modifikation kovalent an das Cystein gebunden.

Eine weitere Technik bedient sich der Spezifität von Transglutaminasen. Diese katalysieren die Acyl-Transferreaktion zwischen der  $\gamma$ -Carboxyamidgruppe eines Akzeptorglutaminrests und eines primären Aminendonors. Da die meisten Transglutaminasen eine stringente Sequenzspezifität aufweisen und gewisse strukturelle Voraussetzungen des Akzeptors verlangen, lässt sich diese Methode nur in einigen wenigen Fällen auf eine limitierte Anzahl von Zielproteinen anwenden [69, 70].

Ferner ist es durch die HaloTag Technologie [71] möglich, lebende oder fixierte Zellen, die Fusionen mit dem HaloTag Protein produzieren, sichtbar zu machen oder auch produzierte Fusionsproteine effizient zu isolieren. Dabei macht man sich zunutze, dass das HaloTag-Protein, eine 33 kDa große Mutante einer prokaryontischen Hydrolase, und ein spezifischer Chloroalkyl-Ligand eine stabile kovalente Bindung eingehen. Die Liganden können verschiedene Funktionalitäten wie Fluorophore oder Affinitätsmarker beinhalten.

Diese Vielfalt an diversen Methoden, die zur selektiven Modifikation von verschiedenen Proteinen entwickelt wurden, zeigt deren große Bedeutung für die Aufklärung biologischer und biochemischer Prozesse. Außerdem führen die immer detaillierteren Untersuchungen von biologischen Systemen zu einem stetig steigenden Bedarf an neuen effektiven und selektiven Proteinmodifikationstechniken.

## 1.4 Intein-vermittelte Modifikationen

Inteine oder Intein-vermittelte Techniken lassen sich für eine Vielzahl an unterschiedlichen Anwendungen, wie z.B. für die Reinigung, zur selektiven Modifikation, sowie zum segmentellen Aufbau von Proteinen einsetzen. Inteine vermitteln dabei eine mehrstufige Reaktion, die in Analogie zum RNA-Spleißen als Proteinspleißen bezeichnet wird. Das folgende Kapitel soll einen generellen Überblick über Inteine geben, sowie den Prozess des Proteinspleißens näher beleuchten.

### 1.4.1 Inteine & Proteinspleißen

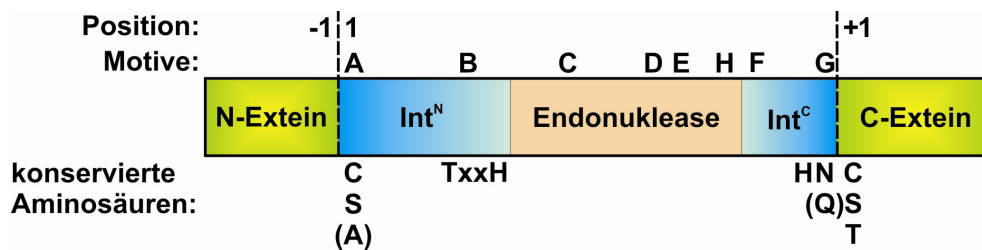
Inteine sind Polypeptidsequenzen, die sich aus einem Vorläuferprotein autokatalytisch herausschneiden und dabei die beiden flankierenden Proteinfragmente, die sogenannten Exteine, durch eine native Peptidbindung miteinander verknüpfen [72]. Als Produkte entstehen bei dieser post-translationalen Reaktion demnach das Spleißprodukt, bestehend aus den beiden verknüpften Exteinen, sowie das herausgeschnittene Intein. Für diese Reaktion werden weder zusätzliche Kofaktoren noch eine andere Art der Aktivierung benötigt, so dass allein die Primärsequenz und die daraus resultierende Tertiärstruktur des Inteins für die Katalyse der Proteinspleißreaktion ausreichend sind. Bis heute wurden über 300 Inteine in Archaeobakterien, Bakterien und Eukaryonten anhand von Sequenzhomologien theoretisch erfasst [73], wobei in vielen Fällen der experimentelle Beweis für die Funktionsfähigkeit noch nicht erbracht wurde. In mehrzelligen Organismen sind jedoch bislang noch keine Inteine gefunden worden. Alle bisher gefundenen Inteine umfassen zwischen 134 und >1000 Aminosäuren und sind in der Inteindatenbank (InBase, <http://www.neb.com/neb/inteins.html>) aufgeführt [74]. Inteine sind zumeist in essentielle Proteine integriert, die Aufgaben im Bereich der DNA-Replikation und Reparatur erfüllen. Dabei sind sie oftmals in hochkonservierten Bereichen oder in aktiven Zentren der Wirtsproteine zu finden [75].

Anhand ihrer unterschiedlichen Größe und Funktion lassen sich Inteine in drei Klassen einteilen:

- Maxi-Inteine mit integrierter Homing-Endonukleasedomäne
- Mini-Inteine, denen die Homing-Endonukleasedomäne fehlt
- Gespaltene Inteine

Maxi-Inteine haben durch die Homing-Endonukleasedomäne noch die Möglichkeit sich nach der Spleißreaktion in Intein-freie Allele zu verbreiten [72, 76], während natürliche Mini-Inteine dazu nicht in der Lage sind, da sie anstelle der Endonukleasedomäne nur einen kurzen flexiblen Bereich besitzen.

Durch Vergleich der bekannten Inteine und anhand zusätzlicher Mutationsstudien konnte gezeigt werden, dass alle Inteine streng konservierte Bereiche besitzen [73, 77]. In Abbildung 13 ist ein typisches Maxi-Intein mitsamt konservierter Struktur motive, der Nummerierung der Aminosäurepositionen, sowie den essentiellen Aminosäureresten schematisch dargestellt.

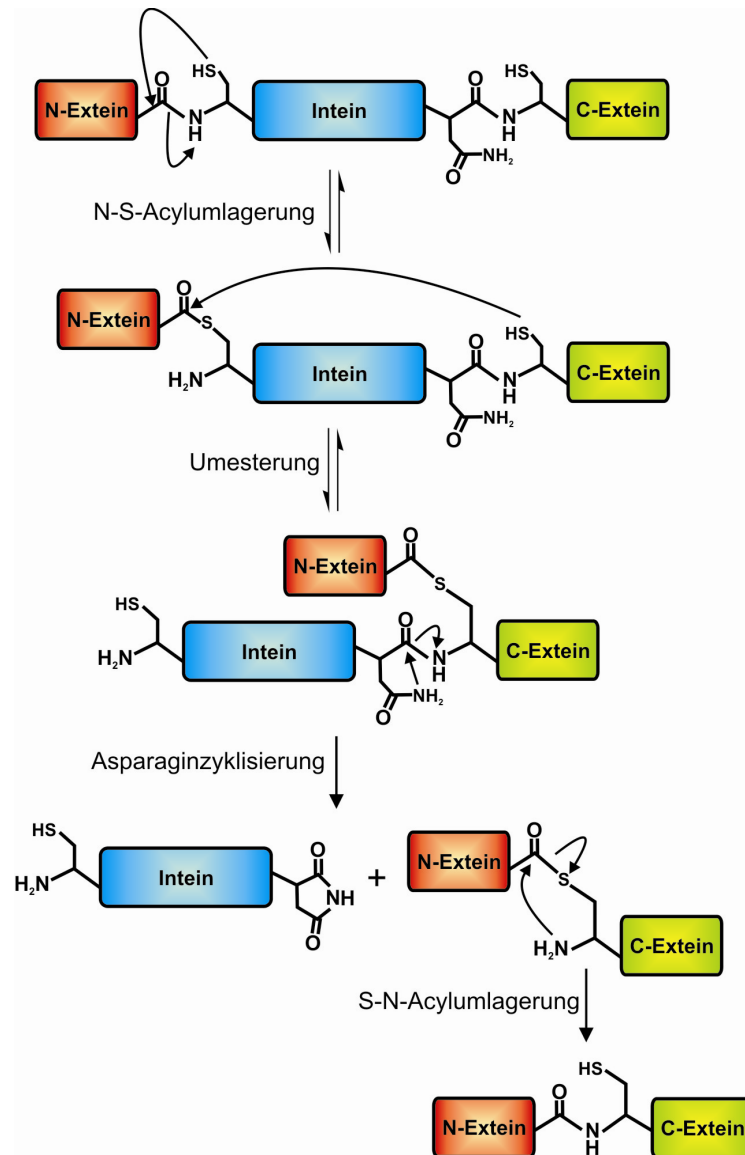


**Abbildung 13: Schematische Darstellung eines typischen Maxi-Inteins.** Spezifische Motive (A-G) innerhalb der N- und C-terminalen Spleißbereiche (Int<sup>N</sup> und Int<sup>C</sup>), sowie der Homing Endonuklease Domäne sind ebenso zu sehen wie konservierte Aminosäuren. Eher selten vorkommende Aminosäuren sind in Klammern angegeben.

Die erste Aminosäure eines Inteins (Position 1) ist in den meisten Fällen ein Nukleophil. In vielen Inteinen wurde an dieser Position ein Cystein, oder Serin gefunden; in einigen wenigen Fällen auch eine nicht-nukleophile Aminosäure wie Alanin. Auch Glutamin und Prolin wurden in Einzelfällen anhand von Sequenzanalysen theoretisch erfasst, allerdings fehlen in diesen Fällen noch experimentellen Beweise für ihre Funktionstüchtigkeit. Am C-Terminus des Inteins findet sich häufig ein Asparagin- oder seltener auch ein Glutaminrest. Davor befindet sich in den allermeisten Fällen Histidin, das die Asparaginzyklisierung und damit die Abspaltung des Inteins unterstützt. Auch die erste Aminosäure des C-terminalen Exteins (Position +1) besitzt eine hoch konservierte und nukleophile Seitenkette. In Archaeobakterien ist dies zumeist die Hydroxylgruppe von Serin oder Threonin und in mesophilen Organismen eine Thiolgruppe einer Cysteinseitenkette. Zudem gibt es auch in der N-terminalen Spleißregion, genauer im Spleißmotiv B eine weit verbreitete Konsensussequenz bestehend aus Thr-Xaa-Xaa-His, die maßgeblich am Bruch der ersten Peptidbindung beteiligt ist.

Der Mechanismus des Proteinspleißens konnte im Wesentlichen durch Untersuchungen mit dem Intein der hitzestabilen DNA-Polymerase aus *Pyrococcus species* GB-D (*Psp*-GBD Pol Intein) aufgeklärt werden, da hier Proteinspleißen erst bei höheren Temperaturen von 37°C ablaufen kann. Damit war es möglich, Zwischenstufen der Reaktion

bei einer Temperatur von 4-12°C zu isolieren und zu analysieren [78-82]. In Abb. 14 ist der derzeit allgemein akzeptierte Mechanismus des Proteinspleißens dargestellt [83].



**Abbildung 14: Mechanismus der Proteinspleißreaktion.** Der erste Schritt ist der nukleophile Angriff der ersten Inteinaminoäure (Pos. 1) auf die davor liegende Carbonylgruppe. Dadurch wird die erste Peptidbindung an der N-terminalen Spleißstelle unter Ausbildung eines (Thio)esters gespalten. Der Angriff der nukleophilen Seitenkette der ersten C-Exteinaminoäure (Pos. +1) führt über eine Umesterungsreaktion zur Ausbildung eines verzweigten Intermediates. Durch Asparaginzyklisierung wird die zweite Peptidbindung gebrochen und das Intein freigesetzt. Als letzter Schritt erfolgt eine S-N-Acylumlagerung, wodurch aus der (Thio)esterzwischenstufe eine stabile Peptidbindung zwischen den beiden Exteinen entsteht.

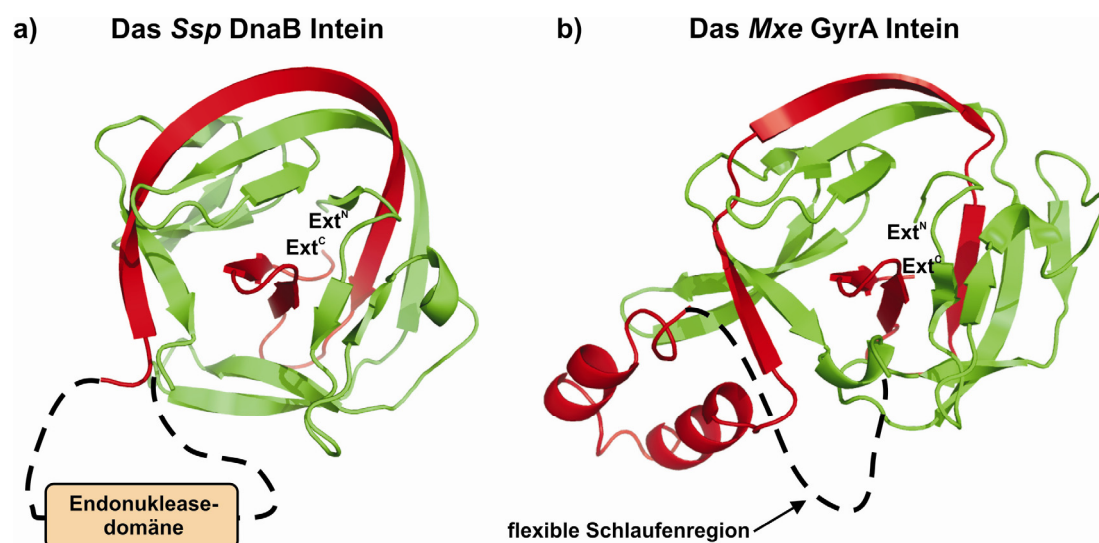
Der erste Schritt des Mechanismus ist der nukleophile Angriff der Thiol- oder Hydroxylgruppe, der ersten Aminosäure des Inteins (Position 1), auf die Carbonylgruppe der Peptidbindung zwischen dem N-Extein und dem Intein. Hierdurch bildet sich in einer energetisch bemerkenswerten Reaktion aus einem Amid ein (Thio)ester. In der folgenden Umesterung greift die nukleophile erste Aminosäure des C-Exteins den entstandenen (Thio)ester an und es bildet sich ein verzweigtes Intermediat, bei dem die beiden Exteine über

eine (Thio)esterbindung miteinander verbunden sind. Die anschließende Asparaginzyklisierung ist irreversibel, wodurch das Intein mit einem Succinimid am C-Terminus abgespalten und eine NH<sub>2</sub>-Gruppe am C-Extein freigelegt wird. Diese kann in einer Umkehrung des ersten Reaktionsschritts den (Thio)ester des verzweigten Intermediates nukleophil angreifen und es bildet sich auf diese Weise eine stabile native Peptidbindung zwischen den beiden Exteinen. Die irreversible Asparaginzyklisierung, zusammen mit der Bildung der Peptidbindung stellen somit den Antrieb der Reaktion dar. Besonders hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass zwei Peptidbindungen (zwischen dem Intein und den beiden Exteinen) gebrochen und nur eine neue Peptidbindung (zwischen den beiden Exteinen) gebildet wird, ohne dass Energiezufuhr von außen benötigt wird. Die einzelnen Schritte des Spleißmechanismus sind in der Natur sehr genau aufeinander abgestimmt, so dass bei strukturellen Veränderungen oder anderen Beeinträchtigungen des Reaktionsablaufs zunehmend Nebenreaktionen auftreten. So sind die beiden (Thio)ester Zwischenprodukte Hydrolyse-empfindlich, was zu einem Reaktionsabbruch und dem Freisetzen des N-Exteins führen kann (N-terminale Hydrolyse). Ferner kann durch eine verfrühte Zyklisierung des Asparagins das Vorläuferprotein gespalten und das C-Extein freigesetzt werden (C-terminale Hydrolyse).

In der Natur kommen am häufigsten die so genannten *cis*-spleißenden Inteine vor, wobei es wesentlich mehr Maxi-Inteine mit integrierter Homing-Endonuklease als Mini-Inteine ohne Endonukleasedomäne gibt. Dabei wurde anhand von Sequenzhomologien die Vermutung aufgestellt, dass die Mini-Inteine vermutlich aus Maxi-Inteinen durch den Verlust der für die genetische Mobilität sorgenden Homing-Endonukleasedomäne hervorgegangen sind. Zu den am besten charakterisierten Maxi-Inteinen gehört neben dem bereits erwähnten *Psp*-GBD Pol Intein aus *Pyrococcus* sp. GB-D [82], das *Mtu* RecA Intein aus *Mycobacterium tuberculosis*, das Maxi-Intein der vakuolären ATPase aus *Saccharomyces cerevisiae* (*Sce* VMA Intein) [84], das *Pfu* RIR1-2 Intein der  $\alpha$ -Untereinheit der Ribonukleosid-Diphosphat-Reduktase aus *Pyrococcus furiosus* [85, 86] und das Intein der Helikase DnaB aus *Synechocystis* sp., PCC6803 (*Ssp* DnaB Intein) [87]. Zu den bislang charakterisierten Vertretern der Mini-Inteine zählen neben dem Intein der Untereinheit A der DNA-Gyrase aus *Mycobacterium xenopi* (*Mxe* GyrA Intein) [88], das bisher kleinste aus 134 Aminosäuren bestehende Intein der Ribonukleosid-Diphosphat-Reduktase aus dem *Methanobacterium thermoautotrophicum* (*Mth* RIR1 Intein) [89], das *Mja* KlbA Intein des *kilB* Operons (ORF A) aus *Methanococcus jannaschii* [90], sowie die Inteine des pre-mRNA Spleißfaktor PRP8 (PRP8 Inteine) aus verschiedenen Organismen (z.B. *Cne* PRP8 aus *Cryptococcus neoformans*

[91], oder *Pvu* PRP8 aus dem *Penicillium vulpinum* [92]). Aufgrund der geringen Anzahl an natürlichen Mini-Inteinen – nur ca. ein Fünftel aller Inteine sind Mini-Inteine – und deren phylogenetischer Verbreitung kann davon ausgegangen werden, dass diese aus mobilen Maxi-Inteinen durch den Verlust der Endonukleasedomäne hervorgingen.

Vergleicht man die Strukturen der verschiedenen Inteine so zeigen sich mehrere Unterschiede aber auch einige auffällige Gemeinsamkeiten. Als Beispiel sollen nachfolgend die Kristallstrukturen des *Ssp* DnaB Inteins, bei dem die Endonukleasedomäne künstlich entfernt wurde [93], sowie die Struktur des natürlichen *Mxe* GyrA Mini-Inteins [94] vorgestellt werden (Abb. 15).



**Abbildung 15: Kristallstruktur des *Ssp* DnaB Inteins ohne Endonukleasedomäne und des *Mxe* GyrA Mini-Inteins.** Beide Inteine zeigen eine überwiegend aus  $\beta$ -Faltblattmotiven bestehende Hufeisenstruktur, wobei die beiden Termini ins Innere gerichtet sind. N-terminale Spleißregionen sind jeweils grün und C-terminale Spleißregionen in rot dargestellt. a) Kristallstruktur des *Ssp* DnaB Inteins (pDB-code: 1MI8) ohne Endonukleasedomäne (aa 1-154), ohne eine flexible Schlaufenregion (aa 99-115) und mit Mutationen C1A und N154A. Die Position der Endonukleasedomäne ist angedeutet. b) Kristallstruktur des *Mxe* GyrA Inteins (pDB code: 1AM2), wobei die aus dem Model entfernte flexible Schlaufenregion (aa 112-129) angedeutet wurde. (Mutationen C1 zu S1 & Insertion A0).

So zeigen beide Inteine eine Hufeisen-förmige Struktur und bilden dabei eine aus 12  $\beta$ -Faltblattmotiven bestehende Hint-Domäne (Hedgehog-Intein-Domäne), die charakteristisch für Inteine und andere autokatalytisch aktive Proteine ist. Dabei sind die N- und C-terminalen für die Spleißreaktion essentiellen Aminosäureseitenketten ins Zentrum der Hufeisenstruktur gerichtet und liegen dicht beieinander. Der auffälligste strukturelle Unterschied zwischen dem GyrA Intein und dem DnaB Intein ist das Auftreten von zwei  $\alpha$ -Helixmotiven, die sich ungefähr an der Position befinden, wo in anderen Inteinen die Endonukleasedomäne zu finden ist. Ihre Funktion ist allerdings nicht bekannt, da sie mit keiner der an der Spleißreaktion beteiligten Aminosäuren in Wechselwirkung treten. Diese  $\alpha$ -Helices sind über eine kurze

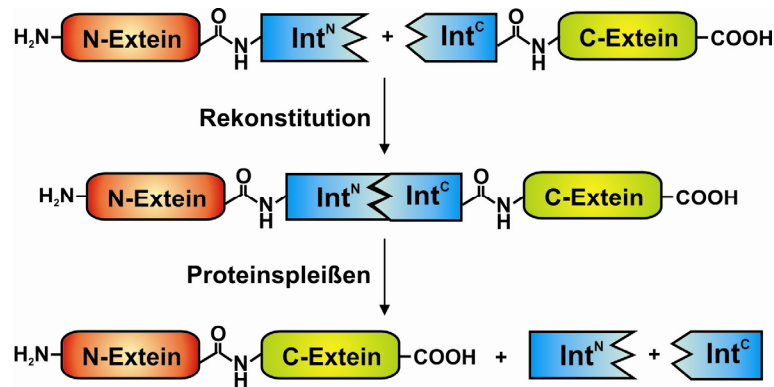
flexible Schlaufenregion mit der aus  $\beta$ -Faltblättern bestehenden Kernstruktur verbunden. Diese Schlaufenregion ist allerdings völlig unstrukturiert und wurde deshalb aus dem Strukturmodell entfernt (schwarze gestrichelte Linie in Abb. 15 b). Für beide Kristallstrukturen wurden die für die Spleißreaktion essentiellen Aminosäuren zu Alanin mutiert.

### 1.4.2 Proteinspleißen in *trans*

Im Unterschied zum bisher beschriebenen Proteinspleißen in *cis* wird das *trans*-Proteinspleißen von gespaltenen Inteinen durchgeführt. Die beiden Inteinhälften liegen dabei zusammen mit den jeweiligen Exteinsequenzen auf zwei separaten Polypeptidketten (N-Extein-Int<sup>N</sup> und Int<sup>C</sup>-C-Extein). Dem bereits gezeigten Spleißmechanismus muss also noch ein Schritt vorausgehen, nämlich die Assoziation der beiden Inteinhälften zum aktiven Intein (Abb. 16). Anhand von kinetischen Untersuchungen am Beispiel des *Ssp* DnaE Inteins konnte dabei gezeigt werden, dass die *trans*-Proteinspleißreaktion der gespaltenen Inteine sehr schnell mit Geschwindigkeitskonstanten von  $6,6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  verläuft [95]. Die Inteinhälften zeigten dabei eine extrem schnelle Assoziationsgeschwindigkeit ( $2,8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) und eine langsame Dissoziationsgeschwindigkeit ( $1,2 \text{ s}^{-1}$ ) [96-98]. Bis heute sind nur wenige natürliche Vertreter der gespaltenen Inteine bekannt. Am besten charakterisiert wurden dabei die aus Cyanobakterien stammenden DnaE Inteine (z.B. *Ssp* DnaE, *Npu* DnaE, *Nsp* DnaE, *Tvu* DnaE) [99-102] und das Intein aus der DNA Polymerase aus dem thermophilen *Nanoarchaeum equitans* (*Neq* Pol Intein)[103].

Im Falle des DnaE Proteins, ist die  $\alpha$ -Untereinheit der DNA-Polymerase III in zwei Teile geteilt, und wird zusammen mit einem N- und einem C-terminalen Inteinteil von zwei getrennten Genen, *dnaE-n* und *dnaE-c*, kodiert. Bei *Synechocystis sp.* PCC6803 liegen diese ca. 750 kbp voneinander entfernt auf entgegengesetzten Strängen des Genoms. Durch Expression der beiden Gene entstehen ein 123 Aminosäure langer N-terminaler Inteinteil und ein 36 Aminosäure langes C-terminales Inteinfragment, wodurch nach *trans*-Proteinspleißen aktives DnaE Protein entsteht [99]. Der schematische Ablauf einer Proteinspleißreaktion in *trans* ist in Abbildung 16 gezeigt.



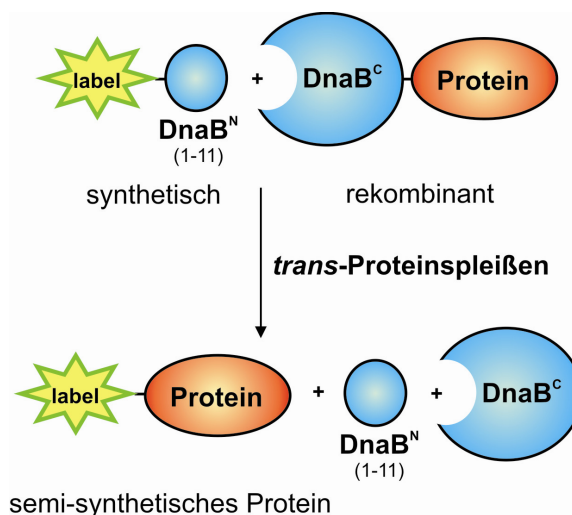


**Abbildung 16: Schematische Darstellung von Proteinspleißen in *trans*.** Der eigentlichen Proteinspleißreaktion geht hier noch ein Schritt, nämlich die Assoziation der beiden Inteinhälften zum aktiven Intein, voraus.

Nach dessen Entdeckung im Jahr 1998 wurde zunehmend versucht, artifizielle *trans*-spleißende Inteinsysteme zu generieren, indem man bekannte Maxi-Inteine in zwei Teile spaltete. So konnte z.B. das 537 Aminosäuren umfassende *Psp*-GBD Pol Intein aus *Pyrococcus sp.* GB-D an mehreren Stellen innerhalb der Homing-Endonukleasedomäne gespalten werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Inteinfragmente nach Reinigung, Denaturierung in 6 M Harnstoff und anschließender Renaturierung sowohl Endonuklease- als auch Spleißaktivität besaßen [82]. Eine Deletion innerhalb der Endonukleasedomäne führte dagegen zum Verlust jeglicher Aktivität. Auch im Falle des aus 440 aa bestehenden *Mtu* Rec A Inteins aus *Mycobacterium tuberculosis* war ein Denaturierungs- und Renaturierungsschritt notwendig. Allerdings konnte hier die komplette Endonukleasedomäne ohne vollständigen Verlust der Spleißaktivität entfernt werden [104, 105].

Ein interessanter Aspekt ergab sich bei der Untersuchung des *Sce* VMA Inteins. Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Aktivität der Endonukleasedomäne unabhängig von der Spleißaktivität der beiden flankierenden Spleißbereiche ist, wurde das *Sce* VMA Intein künstlich gespalten. Die Endonukleasedomäne wurde dafür zunächst herausgeschnitten und durch ein kurzes flexibles Verbindungsstück ersetzt [106], und anschließend, nachdem Spleißaktivität nachgewiesen wurde, komplett weggelassen. Getrennt voneinander und mit Hälften des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) fusioniert, wurde jedoch kein Proteinspleißen beobachtet. Erst eine zusätzliche Fusion der beiden Inteinhälften mit Calmodulin und dessen Zielpeptid M13 führte zum gewünschten Spleißprodukt [107]. Die beiden Inteinhälften  $\text{VMA}^{\text{N}}$  und  $\text{VMA}^{\text{C}}$  konnten also, obwohl sie keine natürliche Affinität zueinander besaßen, zur Rekonstitution des aktiven Inteins gebracht werden, indem sie über affinitätsvermittelnde Domänen in räumliche Nähe gebracht wurden.

Ebenfalls sehr interessant sind die Arbeiten am DnaB Intein von Sun *et al.* [108]. Dabei wurden exponierte Bereiche des Proteins, wie flexible Schlaufenregionen und Übergänge zwischen  $\beta$ -Faltblattstrukturmotiven, hinsichtlich ihrer Eignung als Schnittstellen zur Herstellung eines gespaltenen Inteins systematisch untersucht. Mit diesem Ansatz konnten einige Spaltstellen mit Spleißaktivität identifiziert werden. Darunter war auch eine ganz außergewöhnliche Spaltstelle. Eine Spaltung zwischen Alanin und Serin an Position 11 führte zu zwei Inteinfragmenten, die nach Coexpression in *E. coli* immerhin noch eine 48%ige Spleißeffizienz *in vivo* zeigten. Das ungewöhnliche daran war die Tatsache, dass der N-terminale Inteinteil ( $\text{DnaB}^{\text{N}}$ ) nur aus 11 Aminosäuren (1-11) bestand, während der C-terminale Teil ( $\text{DnaB}^{\text{C}}$ ) mit seinen 143 Aminosäuren (12-154) fast den gesamten Teil des DnaB Inteins ausmachte. Nichtsdestotrotz waren beide Teile notwendig, um Proteinspleißen beobachten zu können. In einer weiteren Arbeit konnte dieser Ansatz durch den Einsatz gereinigter Proteine noch erweitert werden. Dabei war es möglich, den N-terminalen Teil des Inteins über Festphasenpeptidsynthese (SPPS, engl. solid phase peptide synthesis) herzustellen und so unnatürliche Gruppen wie z.B. Fluorophore oder Biotin in die Exteinsequenz einzubauen. Durch die *trans*-Spleißreaktion des auf diese Weise synthetisierten modifizierten Peptids mit einem durch rekombinante Genexpression erhaltenen Fusionsprotein, bestehend aus dem komplementären C-terminalen Intein und einem Zielprotein, erhält man ein am N-Terminus modifiziertes semi-synthetisches Zielprotein. Dieses von Ludwig *et al.* [109] entwickelte Verfahren ist in Abbildung 17 zu sehen.

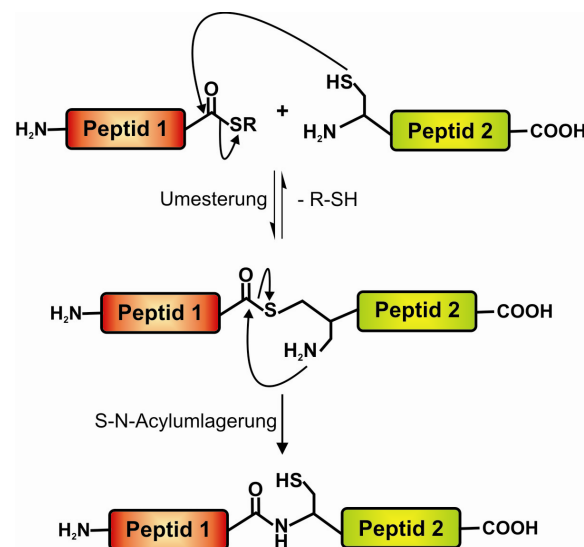


**Abbildung 17: N-terminale Proteinmodifikation durch Herstellung von semi-synthetischen Proteinen mittels *trans*-Proteinspleißen.** Die ersten 11 Aminosäuren des *Ssp* DnaB Inteins ( $\text{DnaB}^{\text{N}}$ , 1-11) werden zusammen mit einer modifizierten N-Exteinpeptidsequenz durch Festphasenpeptidsynthese hergestellt. Durch Zugabe eines rekombinant hergestellten Fusionsproteins aus dem restlichen DnaB Intein ( $\text{DnaB}^{\text{C}}$ ) und einem Zielprotein findet *trans*-Proteinspleißen statt. Dadurch wird die modifizierte N-Exteinsequenz durch eine Peptidbindung mit dem Zielprotein verbunden und es entsteht ein semi-synthetisches am N-Terminus modifiziertes Protein.

## 1.5 Chemische Ligationsreaktionen

Zahlreiche Fragestellungen bezüglich der Struktur und Funktion von Proteinen konnten mithilfe von chemischen Ligationsreaktionen geklärt werden. Neben den bereits erwähnten bioorthogonalen Reaktionen, wie z.B. der Staudinger Ligation, spielt dabei besonders die als „native chemische Ligation“ bezeichnete Reaktion zwischen einem Peptid mit C-terminaler Thioesterfunktion und einem Peptid mit N-terminalem Cystein [9, 110] eine entscheidende Rolle. Damit konnten Proteine aus Peptidfragmenten zusammengesetzt werden, wobei die einzelnen Peptide entweder unnatürliche Aminosäuren besaßen [111], segmentell isotoptenmarkiert [112] oder gezielt post-translational modifiziert waren [113].

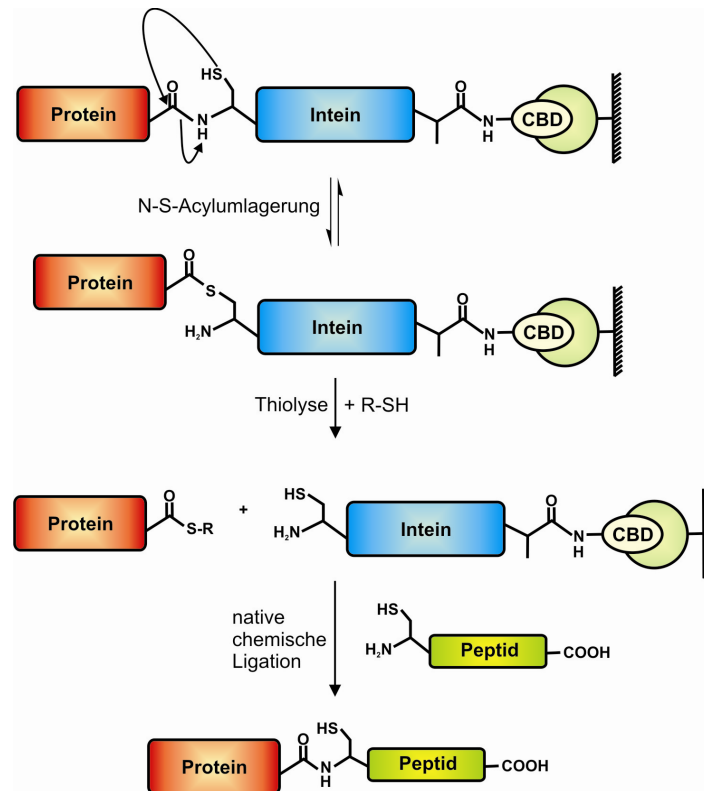
Der Mechanismus der „nativen chemischen Ligation“ ist in Abbildung 18 dargestellt. Der Reaktionsablauf beginnt mit dem nukleophilen Angriff der Thiolgruppe des N-terminalen Cysteins auf die Carbonylgruppe des Thioesterpeptids. Durch eine Umesterung werden die beiden Peptide über eine Thioesterbindung miteinander verknüpft. In einer nun folgenden intramolekularen Umlagerung entsteht die stabilere Peptidbindung. Diese Reaktion läuft in wässriger Lösung schnell und quantitativ ab, ohne dass andere reaktive Gruppen innerhalb der beteiligten Peptide geschützt werden müssen.



**Abbildung 18: Mechanismus der "nativen chemischen Ligation".** Durch nukleophilen Angriff der Thiolgruppe des N-terminalen Cysteins auf die Carbonylgruppe des Thioesterpeptids werden beide Peptide über eine Thioesterbindung miteinander verbunden. Der folgende intramolekulare Angriff der Aminogruppe auf den Thioester führt zur Bildung einer stabilen Peptidbindung zwischen beiden Peptiden.

Eine Variante der „nativen chemischen Ligation“ nutzt den gleichen Mechanismus für die Ligation von rekombinant hergestellten Proteinen mit Peptiden, bzw. von Proteinen mit anderen Proteinbausteinen aus. Die einzige Voraussetzung ist, wie bei der nativen chemischen

Ligation, dass ein Teil eine C-terminale Thioesterfunktionalität und der Reaktionspartner entsprechend eine N-terminale Cysteinseitenkette trägt. Die Herstellung von Proteinen mit C-terminalem Thioester ist auf zwei unterschiedliche Arten möglich. Zum einen kann diese Funktionalität durch Festphasenpeptidsynthese erzeugt werden. Dabei ist allerdings die Größe des Proteins limitierend. Ein Zugangsweg zu größeren Proteinen (>50 aa) mit C-terminalem Thioester bieten mutierte Inteine. Eine Mutation der letzten Aminosäure des Inteins von Asparagin zu Alanin führt dazu, dass die ersten Schritte der Spleißreaktion stattfinden, diese dann aber auf der Stufe eines Thioesterintermediates stehen bleibt, da eine Zyklisierung nicht mehr möglich ist. Diese Protein-Intein-Thioester können anschließend durch Zugabe eines großen Überschusses eines freien Thiols gespalten werden. Durch geeignete Thiole, wie z.B. dem Natriumsalz der Mercaptoethansulfonsäure (MESNA), können auf diese Weise stabile Thioester erzeugt werden. Das Intein besitzt zumeist eine zusätzliche Affinitätsdomäne, z.B. die Chitin bindende Domäne (CBD) und bleibt dadurch an einer Matrix gebunden. Durch die Zugabe eines Peptides (oder anderen Proteins) mit N-terminalem Cystein, kommt es zur Verknüpfung der beiden Bausteine über eine Peptidbindung. Diese Kombination aus der nativen chemischen Ligation und der Intein-vermittelten Herstellung von Proteinthioestern wird als „Expressed Protein Ligation“ (EPL) bezeichnet [10, 114] und ist in Abbildung 19 gezeigt. Hierbei können sowohl Peptide als auch ganze Proteine eingesetzt werden.



**Abbildung 19: Mechanismus der Expressed Protein Ligation.** In einem ersten Schritt wird durch ein mutiertes Intein ein Protein-Intein-Thioester gebildet, der durch Zugabe bestimmter Thiole gespalten wird. Das Intein bleibt dabei über eine affinitätsvermittelnde Domäne an eine Matrix gebunden. In einem zweiten Reaktionsschritt reagiert der stabile Thioester mit einem Cysteinpeptid zum chemischen Ligationsprodukt. Dabei ist das Protein mit dem Peptid über eine Peptidbindung verbunden.

Die vielfältigen Anwendungen von EPL und dem Proteinspleißen sind vor allem in der Tatsache begründet, dass die Aktivität der meisten Inteine auch erhalten bleibt, wenn sie aus ihrer natürlichen Umgebung herausgenommen und zwischen zwei beliebige Exteine gesetzt werden. Dies macht sie zu einem praktischen Werkzeug, um rekombinante oder synthetische Peptidsequenzen miteinander zu ligieren. Es können z.B. aus verschiedenen Peptidsequenzen intakte Proteine gebildet werden, die dann unnatürliche Aminosäuren (z.B. fluoreszierende, biotinylierte, phosphorylierte, glykosylierte Aminosäuren) tragen können. Auch die segmentelle Isotopenmarkierung für NMR-Untersuchungen ist so möglich. Dafür wird ein Teil eines Proteins durch Genexpression in entsprechendem Medium isoto-pen-markiert, während der andere Teil unmarkiert bleibt. Durch Verknüpfung der beiden Bausteine durch NCL, EPL oder *trans*-Proteinspleißen kann so ein vollständiges, segmentell isoto-pen-markiertes Protein generiert werden.

Mit diesen Methoden ist auch die Herstellung von zirkulären Peptiden möglich. Die Proteinspleißreaktion eines Konstruktes bestehend aus  $\text{Int}^{\text{C}}$ -Peptid- $\text{Int}^{\text{N}}$  führt zu einem zyklischen Peptid [100], da zwischen N- und C-Terminus des Peptids eine native Peptidbindung ausgebildet wird und das Intein sich selbst ausschneidet. Das lineare Peptid

stellt demnach formal gleichzeitig N- und C-Extein dar. Auch über eine Kopf-zu-Schwanz-Ligation lässt sich die Zyklisierung eines Peptids realisieren, wenn gleichzeitig ein N-terminales Cystein und ein C-terminaler Thioester in demselben Peptid gebildet werden [115].

## 1.6 Aufgabenstellung

Die Herstellung von neuen gespaltenen Inteinen hat zu einer Vielzahl neuer Anwendungsmöglichkeiten für die Untersuchung von Struktur, Dynamik, Funktion und Interaktionen von Proteinen beigetragen. Erschwert wird dies generell durch die Tatsache dass die meisten bekannten künstlich gespaltenen Inteine denaturiert und zurückgefaltet, oder aber durch zusätzliche Fusion mit Heterodimerisierungsdomänen in räumliche Nähe zueinander gebracht werden müssen, damit der Prozess des Proteinspleißens ablaufen kann. Eine wichtige Ausnahme stellt in diesem Sinne das künstlich gespaltene DnaB Intein aus *Synechocystis sp.* PCC6803 dar, da es keinen von beiden Schritten benötigt. Vielmehr konnte im Verlauf dieser Arbeit gezeigt werden, dass die beiden Inteinfragmente spontan zum aktiven Intein assoziieren. Das Vorhandensein eines Cystein-freien C-terminalen Teils und die breite Toleranz bezüglich der Exteinsequenzen sollten die entscheidenden Voraussetzungen sein, ein generelles Verfahren zur C-terminalen Modifikation von Proteinen zu entwickeln. Hierbei sollte in einem ersten Schritt eine beliebige Funktionalität über einfache Cysteinbiokonjugation in die C-terminale Exteinsequenz eingeführt und diese in einem zweiten Schritt an ein beliebiges Protein durch *trans*-Proteinspleißen gehängt werden. In weiteren Untersuchungen sollte die Variabilität des Ansatzes hinsichtlich der möglichen Modifikationsreagenzien, des verwendeten Inteins, sowie hinsichtlich der zu modifizierenden Zielproteine überprüft werden. Ausgehend von einem Modellprotein, sollten weiter anspruchsvolle Cystein-reiche Proteine regioselektiv mit dem Cys-tag modifiziert werden. Diese verschiedenen Zielproteine sollten sowohl mit verschiedenen fluoreszierenden Sonden, als auch mit anderen chemischen Gruppen, wie beispielsweise Biotin, oder Polymereinheiten modifiziert und anschließend auf ihre enzymatische Aktivität hin untersucht werden.

## 2 Materialien

### 2.1 Verwendete Geräte

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Geräte verwendet.

**Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte.**

Gerät	Hersteller mit Typenbezeichnung
-80°C Gefrierschrank	<i>New Brunswick Scientific</i> Ultra low temperature freezer
Agarosegel-Apparatur	<i>PEQLAB</i> Perfect Blue Gelsystem
Analysenwaage	<i>Mettler</i> PM400
Autoklav	Varioklav Dampfsterilisator
Elektroporationssystem	<i>Bio-Rad</i> Gene Pulser und Pulse-Controller
Emulsifier	<i>Avestin</i> EmulsiFlex®-C5 High pressure homogenizer
FPLC-Anlage	<i>GE Healthcare</i> Äkta prime plus
Gefriertrocknungsanlage	<i>Christ</i> LT-105
Heizblock	<i>Eppendorf</i> ThermoStat plus
HPLC-Anlage	<i>Agilent</i> 1100 Series mit DAD-Detektor, Vakuumentgaser, quaternärer Pumpe, Autosampler und HP-Chemstation
Inkubationsschrank	<i>Memmert</i>
Inkubationsschüttler	<i>New Brunswick Scientific</i> I26
Luftschüttler	<i>Infors</i> HT Aerotron
MALDI-TOF	<i>Bruker</i> AutoFlex III
PCR-Gerät	<i>Biometra</i> Tpersonal Kombi
pH-Meter	<i>HANNA instruments</i> pH211 Microprocessor pH-Meter
Photodokumentationsanlage	<i>Canon</i> PowerShot G5
Photometer	<i>Amersham Biosciences</i> Ultrospec 3100 pro
Reinstwasseranlage	<i>Millipore</i> Milli-Q
SDS-PAGE-Apparatur	<i>BioRad</i> Mini-PROTEAN 3 Cell
Ultraschallbad	<i>Bandelin</i> Sonorex Digitec
UV-Schirm	<i>H. Saur</i> Transilluminator IL-200-M (312 nm)
Zentrifugen	<i>Eppendorf</i> Centrifuge 5424 <i>Eppendorf</i> Centrifuge 5702R <i>Sorvall</i> Evolution RC

## 2.2 Chemikalien, Enzyme & Verbrauchsmaterialien

Alle in Tabelle 2 nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma Aldrich (München), Roth (Karlsruhe) oder AppliChem (Darmstadt) in p.a. Qualität bezogen. Der Großteil der Verbrauchsmaterialien wurde in überragender Qualität von der Firma Sarstedt bezogen.

**Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien, Enzyme & Verbrauchsmaterialien.**

Hersteller	Produkt
AppliChem (Darmstadt)	IPTG, ATP, Coenzym A
Calbiochem (Darmstadt)	Nitrocefin
Fermentas (St. Leon-Rot)	Restriktionsendonukleasen, DTT, Proteinmarker
Fluka	L-Phenylalanin, Mercaptoethanol
Finnzymes	Phusion-Polymerase
GE Healthcare	ECL Western Blotting System, Ni Sepharose 6 Fast Flow
IBA (Göttingen)	Desthiobiotin, Strep-Tactin Sepharose
IRIS Biotech	Polyethylenglykol-5000-Maleinimid (PEG)
Merck KGaA (Darmstadt)	Glukose
Molecular Probes, Invitrogen (Karlsruhe)	5-Iodacetamido-Fluorescein (5-IAF), Alexa Fluor C5 Maleinimid (AF), Texas Red C2 Maleinimid (TR)
NEB (Schwalbach)	Restriktionsendonukleasen, Amylose-Matrix, DNA-Marker
Operon Biotechnologies (Köln)	Oligonukleotide
Pierce Biotech, Perbio Science (Bonn)	Fluorescein-5-Maleinimid (FM), EZ-Link Maleinimid-PEG <sub>2</sub> -Biotin (BM)
Promega	Monomere Avidin-Matrix
Qiagen (Hilden)	QIAquick® Gel Extraction Kit, QIAquick® Spin Säule, Ni <sup>2+</sup> -NTA-Superflow
Roth (Karlsruhe)	L-Prolin, SDS, Rotiphorese
Sigma Aldrich (München)	Insulin, Biotin, TEMED, Trypsin



## 2.3 Vektoren

### 2.3.1 pMAL-c2X

Der Vektor pMAL-c2X (6648 bp) ist ein Bestandteil des „pMAL Protein Fusion and Purification System“ der Firma New England Biolabs (NEB). Es dient der Herstellung von Fusionsproteinen mit dem Maltose-bindenden Protein (MBP) aus *E. coli*, dessen Affinität zu Amylose zur Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie ausgenutzt werden kann. Die Transkription des *malE*-Gens zusammen mit dem klonierten Gen wird durch den *tac*-Promoter reguliert und solange durch Genexpression des *lacI<sup>q</sup>*-Gens (Lac Repressor) reprimiert, bis Isopropylthiogalaktosid (IPTG) zugegeben wird. Es sind zwei Transkriptionsterminatoren (abgeleitet vom Vektor pKK233-2) des *rrnB* Operons enthalten. Das Ampicillinresistenz verleihende  $\beta$ -Laktamasegen, sowie der Replikationsursprung ColE1 stammen aus pBR322. Der Replikationsursprung M13 ist aus pZ150. (Genbanknr.: AX377531)

### 2.3.2 pTrc99a

Der Vektor pTrc99a (4176 bp) der Firma Pharmacia ist ein Derivat von pKK233-2 und besitzt einen *trc*-Promotor, eine multiple cloning site (MCS) und die Terminatorsequenzen *rrnB* T1 und T2. Das *lacI<sup>q</sup>*-Gen verhindert die Expression, bis IPTG in einer Konzentration von 1 mM zugegeben wird. Das Plasmid verleiht zudem Ampicillinresistenz und besitzt den Replikationsursprung ColE1 aus pBR322. (Genbanknr.: U13872)

### 2.3.3 pET16b

Der pET16b-Vektor (5711 bp) der Firma Novagen verfügt über eine N-terminale His<sub>6</sub>-tag Sequenz mit anschließender Faktor Xa-Protease Schnittstelle. Die Expression des Zielgens wird durch einen T7-Promotor reguliert und das *lacI<sup>q</sup>*-Gen reprimiert eine Genexpression bis zur Zugabe von IPTG. Außerdem wird dem Plasmid durch das *bla*-Gen eine Ampicillin-Resistenz verliehen und die Vervielfältigung geschieht über den ColE1 Replikationsursprung aus pBR322.

### 2.3.4 pQE30

Der pQE30-Vektor (3461 bp) der Firma Qiagen verfügt über eine N-terminale His<sub>6</sub>-tag Sequenz vor der MCS. Die Genexpression wird durch einen T5-Promotor reguliert. Das Plasmid verleiht Resistenz gegen Ampicillin durch die Expression des  $\beta$ -Lactamase-Gens *bla* und repliziert sich in *E. coli* mittels des Replikationsursprungs ColE1 aus pBR322. Die Regulation der Genexpression erfolgt durch zwei aufeinander folgende *lac*-Operatorsequenzen. Das *lac*-Repressorgen ist auf diesem Plasmid nicht kodiert.

### 2.3.5 pQE60

Der pQE60-Vektor (3431bp) gehört zu dem „QIAexpressionist“-System der Firma Qiagen. Er besitzt einen *E. coli* T5-Phagen-Promotor, zwei *lac*-Operator-Erkennungssequenzen, sowie eine für *E. coli* optimierte synthetische ribosomale Bindungsstelle RBSII und den Replikationsursprung ColE1. Die Ligation eines Gens in die MCS führt zur Produktion eines Proteins mit einem C-terminalen His<sub>6</sub>-tag. Durch Expression des  $\beta$ -Laktamasegens *bla* vermittelt der pQE60-Vektor eine Resistenz gegen Ampicillin.

### 2.3.6 pTXB1

Der pTXB1-Vektor (6706 bp) gehört zum IMPACT<sup>TM</sup>-System der Firma *New England Biolabs*. Durch Ligation in die MCS entsteht ein Gen das für ein Fusionsprotein mit dem C-terminalen *Mxe* GyrA-Intein aus *Mycobacterium xenopi* und einer chitinbindenden Domäne (CBD) aus *Bacillus circulans* kodiert. Die Genexpression steht unter der Kontrolle des T7-Promotors. Die *lac*-Operatorsequenz vor dem Promotor verhindert die Expression des Gens ohne IPTG. Das Plasmid verleiht durch die Expression des  $\beta$ -Lactamase-Gens *bla* Resistenz gegen Ampicillin und wird in *E. coli* mittels des Replikationsursprungs pMB1 aus pBR322 repliziert. Nach Genexpression des gesamten Fusionsproteins sorgt das mutierte *Mxe* GyrA-Intein dafür, dass durch Zugabe kleiner löslicher Thiole das Zielprotein freigesetzt wird. Es entsteht je nach Thiol entweder ein stabiler Thioester oder nach Hydrolyse die korrespondierende Carbonsäure.

## 2.4 Mikroorganismen

### 2.4.1 *E. coli* DH5α

Dieser Stamm hitzekompetenter *E. coli* Zellen wurde von der Firma Invitrogen (Subcloning Efficiency DH5α) bezogen und für Klonierungszwecke verwendet.

Genotyp: F-Φ80*lacZ*ΔM15Δ(*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>)  
*phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1*λ-

### 2.4.2 *E. coli* XL1 Blue

Der Stamm *E. coli* XL1 Blue wurde für die Herstellung elektrokompenter Zellen für Klonierungsarbeiten benutzt und für Arbeiten mit dem Phagenprotein gpD.

Genotyp: *recA1, endA11, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, F'(proAB<sup>+</sup>, lacI<sub>q</sub>, lacZDM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)).*

### 2.4.3 *E. coli* BL21 Gold (DE3)

Der *E. coli* Stamm BL21Gold (DE3) wurde für die Expression von Plasmid-DNA verwendet. Diesem Stamm fehlen die Proteasen *lon* und *ompT*, wodurch eine signifikante Erhöhung der Proteinstabilität erreicht wird. Er enthält außerdem ein IPTG-induzierbares T7 RNA-Polymerasegen, welches im Chromosom nach *lacZ* und dem Promotor *lacV5* auf einem λ-Prophagen insertiert ist. Das ist essentiell für die Induktion der Expression von Genen, die unter Kontrolle des T7-Promotors stehen. Der Expressionstamm ist außerdem Tetracyclin-resistent und das Gen der Endonuklease I (*endA*) ist inaktiviert.

Genotyp: F-*ompT hsdSB* (rB-mB-) *dcm*<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> *gal* λ(DE3) *endA* Hte

## 2.5 Medien

Für die Anzucht der verwendeten *E. coli* Kulturen wurde ausschließlich LB-Medium verwendet. Festmedium wurde durch Zusatz von 1.5 % (w/v) Agar Nr.1 vor dem Autoklavieren hergestellt.

LB-Medium:           Bactotrypton 10 g/L  
                          Hefeextrakt 5 g/L  
                          NaCl 5 g/L

Dem Medium wurde nach Bedarf Antibiotika in einer Konzentration von 100 µg/mL Ampicillin und/oder 25 µg/mL Kanamycin zugesetzt.

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Konstruktion der rekombinanten Plasmide

Für die Konstruktion der rekombinanten Plasmide wurden für die Plasmidpräparation aus *E. coli* Zellen [116], Reinigung von DNA [117], Herstellung und Verwendung von  $\text{CaCl}_2$ - und elektrokompetenten *E. coli* Zellen und Restriktionsverdau Standard-DNA-Techniken [118] verwendet. Benötigte DNA-Fragmente wurden durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von synthetischen Oligonukleotiden (*Operon*) und der Phusion Polymerase (*Finnzymes*) nach Herstellerangaben amplifiziert. Auch die Reinigung der Amplifikate wurde mit dem „QIAquick-spin PCR purification kit“ nach den Vorschriften des Herstellers (*Qiagen*) durchgeführt. Alle Konstrukte wurden anhand von Restriktionsverdauen und DNA-Sequenzierung analysiert. Für die Klonierung der einzelnen Plasmide wurden in der Regel hitzekompetente *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen oder elektrokompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen verwendet. Die Herstellung der rekombinanten Plasmide ist nachfolgend beschrieben.

#### *Herstellung der Plasmide für die Cys-tag Konstrukte mit dem DnaB<sup>C</sup> Inteinfragment*

Die Inteinfusionen mit dem Cys-tag wurden ausgehend vom *Ssp* DnaB Mini-Intein aus pMST [87] hergestellt. pMST diente als Templat für eine Polymerase Kettenreaktion (PCR), wobei der C-terminale Teil des DnaB-Inteins (DnaB<sup>C</sup>) der Spaltstelle S0 entsprechend unter Verwendung der Oligonukleotide 5'-ATACCATGGGCACTAGTTCACCAGAAATAGAAAAGTTGTC-3' (Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *SpeI* sind unterstrichen) und 5'-ATAGGTACCAGATCTAATACTGTTATGGACAATGATGTC-3' (*KpnI*, *BglII*) amplifiziert wurde. Das gereinigte PCR-Fragment wurde anschließend mit *NcoI* und *BglII* geschnitten und in den gleichermaßen präparierten Vektor pQE60 (*Qiagen*) ligiert, wodurch der Vektor pTK048 (DnaB<sup>C</sup>-His<sub>6</sub>) erhalten wurde. Durch eine Punktmutations-PCR mit den beiden Oligonukleotiden oTK15 (5'-CATAACAGTATTAGATCCTGCGGTCATCACCAT CACCATC-3') und oTK16 (5'-GATGGTGTGGTGTATGACCGCAGGATCTAATACT GTTATG-3') wurde die kodierende Sequenz im resultierenden pTK052 so verändert, dass das Genprodukt das zu modifizierende Cystein des Cys-tags in der Exteinsequenz SIRSCGH<sub>6</sub> enthielt. Ebenso diente

das Ausgangsplasmid pTK048 als DNA-Templat für eine PCR mit den beiden Oligonukleotiden oHM116 (5'-ATACCATGGGCACTAGTTCACCAGAAATAGAAAAGTGTGC-3', *Nco*I, *Spe*I) und oTK14 (5'-ATAAGATCTACCGCAACCCTGTTTCGATACTGTTATGGACAATGATG-3', *Bgl*II), die das DnaB<sup>C</sup> kodierende Fragment mit der Exteinsequenz SIEQGCGRSH<sub>6</sub> enthält. Nach Behandlung mit *Nco*I und *Bgl*II wurde auch dieses Fragment wie oben beschrieben in den Vektor pQE60 ligiert, so dass das Expressionsplasmid pTK049 erhalten wurde. Die Plasmide pTK048 und pTK049 wurden mit den Restriktionsenzymen *Spe*I und *Hind*III geschnitten und das Insert in den mit *Xba*I und *Hind*III behandelten Vektor pHM45 [119] ligiert. Dies lieferte die Plasmide pTK054 (kodierend für **MBP-DnaB<sup>C</sup>-SIRSCGH<sub>6</sub>**) und pTK053 (kodierend für **MBP-DnaB<sup>C</sup>-SIEQGCGRSH<sub>6</sub>**). Als Negativkontrolle wurde das Plasmid ohne Cys-tag (pTK048) ebenfalls *Spe*I, *Hind*III geschnitten und gleichermaßen in den Vektor pHM45 kloniert. Auf diese Weise wurde pTK055 (kodierend für **MBP-DnaB<sup>C</sup>-SIRSRSH<sub>6</sub>**) erhalten. Die Fusion des DnaB<sup>C</sup>-Fragmentes mit MBP diente der Steigerung der Expressionsausbeute der jeweiligen Fusionsproteine und konnte ferner zur besseren Reinigung derselben durch eine Amylosesäule verwendet werden.

Das Plasmid pSB34 (**His<sub>6</sub>-gpD-DnaB<sup>C</sup>-SIRSCG**) wurde von S. Brenzel durch PCR-Amplifikation des DnaB<sup>C</sup>-Cys-Genfragmentes aus dem Plasmid pTK054 und den Oligonukleotiden 5'-AATGGATCCTCTAGTTCACCAGAAATAG-3' und 5'-ATAAAGCTTAACCGCAGGATCTAATACTGTTATGG -3' und Ligation in den Vektor pAT37 (von Frank Bernhard) hergestellt.

### *Herstellung der Plasmide mit dem DnaB<sup>N</sup>-Inteinfragment*

Die Expressionsplasmide für die Fusionsproteine mit dem N-terminalen Inteinfragment DnaB<sup>N</sup> (Spaltstelle S0) wurden ausgehend von Plasmid pSB13 [120] hergestellt. Zu dessen Herstellung wurde die Sequenz, die für DnaB<sup>N</sup> kodiert, mit den Oligonukleotiden 5'-ATAGAATTCTCCGGCTGCATCAGTGGAGATAG-3' (*Eco*RI) und 5'-ATAAAGCTTTTATCTAGATAAAGAGGAGCTTTCTAGTTTACG-3' (*Hind*III, *Xba*I) und dem bereits oben erwähnten Plasmid pMST PCR-amplifiziert und über die integrierten *Eco*RI und *Xba*I Schnittstellen in den Vektor pHM41 [119] kloniert. Das resultierende Plasmid pSB13 wurde mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Spe*I geschnitten und das entstehende Vektorfragment religiert, wodurch pTK056 gewonnen werden konnte (kodierend für **MBP-DnaB<sup>N</sup>-His<sub>6</sub>**).

Für die Herstellung von pTK083 (**Bla-DnaB<sup>N</sup>-His<sub>6</sub>**) wurde zunächst das  $\beta$ -Laktamasegen aus dem Plasmid pHM137 über die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Hind*III ausgeschnitten und in einen pQE60-Vektor kloniert, wodurch Bla-His<sub>6</sub> (pCL39 von C. Ludwig) erhalten wurde. In diesen Vektor wurde daraufhin ein DnaB<sup>N</sup>-Genfragment in die *Bgl*II Schnittstelle ligiert, was das Plasmid pTK075 (**Bla-DnaB<sup>N</sup>-His<sub>6</sub>**) ergab. Dieses gesamte Fragment Bla-DnaB<sup>N</sup>-His<sub>6</sub> wurde dann mit den Restriktionsenzymen *Nco*I, *Hind*III ausgeschnitten und in einen pET16b-Vektor (Novagen) ligiert, wodurch pTK083 erhalten wurde.

Zur Konstruktion von pTK077 (**Strep-Trx-DnaB<sup>N</sup>-His<sub>6</sub>**) wurde das für Strep-Thioredoxin kodierende Fragment mit den Restriktionsenzymen *Nco*I und *Eco*RI aus dem von C. Ludwig hergestellten Vektor pCL14 [109] ausgeschnitten und in den Vektor pTK056 ligiert. Aus dem daraus resultierenden Konstrukt pTK076 wurde der gesamte kodierende Bereich *Nco*I/*Hind*III verdaut und in einen ebenso behandelten pET16b-Vektor ligiert. Auf diese Weise wurde das Plasmid pTK077 erhalten.

### *Herstellung der Konstrukte des gespaltenen Mxe GyrA Inteins*

Die DNA-Fragmente für die N- und C-terminalen Intenteile des *Mycobacterium xenopi* GyrA-Inteins wurden aus dem Plasmid pTXB1 (New England Biolabs) mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert.

### *Herstellung der GyrA<sup>N</sup>-Konstrukte*

Das für den N-terminalen Teil des *Mxe* GyrA-Inteins kodierende DNA Fragment (GyrA<sup>N</sup>) wurde durch PCR mit den Oligonukleotiden oTK45 (5'- ATAGAATTCCGCTACTGCATC ACGGGAGATGCACTAGTTGCC -3') und oTK46 (5'- ATATCTAGAGCGGGCAAA ACCTGCACAGTCGACGC -3') als Primer amplifiziert, gereinigt, mit den Restriktionsendonucleasen *Eco*RI und *Xba*I geschnitten und in den gleichermaßen geschnittenen Vektor pSB13 [120] kloniert. So wurde der Vektor pAI13 (**MBP-GyrA<sup>N</sup>-FKBP-His<sub>6</sub>**) erhalten.

Das für das humane Wachstumshormon (hGH) kodierende DNA-Fragment wurde per PCR aus dem Plasmid pC<sub>4</sub>S<sub>1</sub>-F<sub>M</sub>4-FCS-hGH [121] mit den Oligonukleotiden oTK49 (5'-ATA CCATGGGATTCCCAACCATTCCTTAAGC-3') und oTK50 (5'-ATAGAATTTCGAA GCCACAGCTGCCCTCCAC-3') amplifiziert, mit *Nco*I und *Eco*RI geschnitten und über diese Schnittstellen in den Vektor pAI13 kloniert. Der so erhaltene Vektor pTK118 kodiert für **hGH-GyrA<sup>N</sup>-FKBP-His<sub>6</sub>**.

Die nicht-ribosomale Peptidsynthetase TycA wurde aus chromosomaler DNA aus *Bacillus brevis* ATCC 8185 mit den Oligonukleotiden 5'-AATGCTAGCATGTTAGCAAAT CAGGCC-3' und 5'-TTAGAATTCGCGCAGTGTATTTGCAAG-3' amplifiziert und durch die Restriktionsenzyme *NheI* und *EcoRI* in das zuvor beschriebene Plasmid mit N-terminalen Strep-tag ligiert, wodurch pMHTK01 erhalten wurde (von M. Hahn durchgeführt). Davon wurde die für Strep-TycA kodierende Sequenz mit den Enzymen *NcoI*, *EcoRI* ausgeschnitten und in den Vektor pAI13 ligiert, was das Plasmid pTK117 (**Strep-TycA-GyrA<sup>N</sup>-FKBP-His<sub>6</sub>**) ergab. Der His<sub>6</sub>-tag wurde anschließend durch eine Punktmutations-PCR und den Oligonukleotiden 5'-CTAGTTATGGATCCAGATAACTAGTCACCATCACCATCAC-3', sowie dem umgekehrt komplementären Oligonukleotid mithilfe des QuickChange Protokolls entfernt. Auf diese Weise konnte pTK130 (**Strep-TycA-GyrA<sup>N</sup>-FKBP**) erhalten werden.

### *Herstellung der GyrA<sup>C</sup>-Konstrukte*

Das für den C-terminalen Teil des *Mxe* GyrA-Inteins kodierende DNA Fragment (GyrA<sup>C</sup>) wurde durch PCR mit den Oligonukleotiden 5'-ATA ACT AGT GGA AAA CCC GAA TTT GCG CCC -3' und 5'-TTT GGA TCC GGC TTC AGT ATT GTG GCT GAC GAA CCC -3' als Primer amplifiziert, gereinigt, mit den Restriktionsendonukleasen *SpeI* und *BamHI* geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pSB13 kloniert. Aus dem so erhaltenen Vektor wurde das DNA-Fragment zwischen den Erkennungssequenzen der Restriktionsendonuklease von *EcoRI* und *SpeI* entfernt und durch das *EcoRI-SpeI*-Fragment aus pSB15 [120] ersetzt. Dies ergab Vektor pAI15 (**MBP-FRB-GyrA<sup>C</sup>-TEAGSRSH<sub>6</sub>**). Zur Einführung des Cys-tags wurde mit pAI15 als Templat eine Punktmutations-PCR mit den beiden Oligonukleotiden 5'-C AAT ACT GAA GCC GGA TCC TGC GGT CAT CAC CAT CAC CAT CAC-3' und 5'-GTG ATG GTG ATG GTG ATG ACC GCA GGA TCC GGC TTC AGT ATT G -3' durchgeführt. Durch DNA-Sequenzierung des erhaltenen Vektors pCL76 (von C. Ludwig hergestellt) wurde festgestellt, dass neben der Mutation des Arginincodons zu einem Cysteinocodon eine weitere Punktmutation aufgetreten ist (das Glycincodon GGT wurde zum Serincodon AGT), so dass die Exteinsequenz TEAGSCSH<sub>6</sub> als Cys-tag kodiert wurde. Die für FRB kodierende Sequenz wurde mittels der Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *SpeI* ausgeschnitten und der verbleibende Teil des Vektors gereinigt und anschließend religiert. Auf diese Weise wurde das Plasmid pTK120 erhalten (**MBP-GyrA<sup>C</sup>-TEAGSCSH<sub>6</sub>**).



### 3.1.2 DNA-Sequenzierung

Die Richtigkeit aller beschriebenen Konstrukte wurde durch Analyse von Restriktionsverdauen, sowie durch DNA-Sequenzierung durch die Firma *GATC-Biotech* (Konstanz) verifiziert.

## 3.2 Proteinchemische Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Standardtechniken der Proteinanalytik (SDS-PAGE, Coomassie-Färbung der SDS-Gele und Bestimmung der Proteinkonzentration) wurden nach Laemmli [122], Bennett [123] und Bradford [124] durchgeführt und werden hier nicht weiter beschrieben.

### 3.2.1 Genexpression in *E. coli*

Für die Herstellung der Expressionstämme wurden geeignete *E. coli*-Zellen (in der Regel *E. coli* BL21 (DE3) oder *E. coli* BL21 Gold (DE3)) mit den entsprechenden, gereinigten Plasmiden transformiert. Für die Expression von Konstrukten, die das gpD-Gen des Kopfproteins des  $\lambda$ -Bakteriophagen trugen, wurden *E. coli* XL1-Blue-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transformiert. Für die Produktion der rekombinanten Proteine wurden nun 300 mL LB-Medium (Amp<sup>100</sup>) mit einer 3 mL Übernachtskultur (ÜNK) des entsprechenden Expressionsstamms inokuliert, wobei im Medium das entsprechende Antibiotikum und für die Expression von MBP-haltigen Genen zusätzlich noch 0,2 % (v/v) Glukose vorhanden war. Die Zellen wurden bei 37°C und 250 rpm in einem Luftschüttler inkubiert, bis eine OD<sub>600 nm</sub> von 0,5-0,7 erreicht wurde. Daraufhin wurde die Temperatur auf 25-30°C gesenkt und die Expression durch Zugabe von 0,4 mM IPTG induziert. Nach weiteren 3-4 h wurden die Zellen durch Zentrifugation (7.000 rpm, 4°C, 15 min) pelletiert. Das Zellpellet wurde in einem geeigneten Puffer resuspendiert und konnte anschließend bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

### 3.2.2 Zellaufschluss

Die resuspendierten Zellen wurden mithilfe eines Emulsifiers (EmulsiFlex<sup>®</sup>-C5 High pressure homogenizer der Firma *Avestin*) aufgeschlossen. Dabei sorgte ein Druckunterschied von ca. 7 MPa dafür, dass die Zellwände durch die entstehenden Scherkräfte zerstört und die im Cytosol vorliegenden Proteine freigesetzt wurden. Für einen vollständigen Zellaufschluss

wurde die Prozedur zweimal wiederholt. Zelltrümmer und andere unlösliche Bestandteile wurden durch einen Zentrifugationsschritt (17.000 rpm, 4°C, 30 min) abgetrennt, und der klare Überstand konnte direkt für die Affinitätschromatographie verwendet werden.

### 3.2.3 Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie

Alle hergestellten Proteine wurden zuerst mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Alle Proteine besaßen mindestens einen Affinitätstag, der sich entweder am N- oder am C-Terminus befand. Alle His<sub>6</sub>-tag tragenden Proteine wurden dementsprechend mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Chromatographie gereinigt, während zur Amylose-Säulenchromatographie das Vorhandensein des Maltose-bindenden Proteins (MBP) ausgenutzt wurde. Alle *Strep*-tag II tragenden Proteine konnten mithilfe einer *Strep*-Tactin-Matrix gereinigt werden und biotinylierte Proteine konnten durch Immobilisierung an eine monomere Avidin-Matrix und anschließender Elution gereinigt werden. Alle gereinigten Proteine wurden hinterher durch SDS-PAGE analysiert und die Konzentration durch photometrische Messung der Absorption bei 280 nm unter Berücksichtigung des berechneten Extinktionskoeffizienten (Abschnitt 3.2.3.6) ermittelt. Die theoretischen Extinktionskoeffizienten wurden mithilfe des Programmes *Protean* (Lasergene) berechnet.

#### 3.2.3.1 Ni<sup>2+</sup>-NTA-Chromatographie

Die Reinigung von His<sub>6</sub>-tragenden Proteinen erfolgte über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Chromatographie, eine IMAC-Variante (engl. immobilized-metal affinity chromatography) [125]. Als Säulenmaterial wird hierfür an eine Agarosematrix gebundene Ni<sup>2+</sup>-Nitrilotriessigsäure (NTA, engl. Nitrilotriacetic acid) verwendet. Nitrilotriessigsäure ist ein vierzähliger Chelatligand, der die Ni<sup>2+</sup>-Ionen durch Komplexierung an der Matrix immobilisiert. Zur Ausbildung eines oktaedrischen Komplexes werden die zwei übrigen Koordinationsstellen durch Wassermoleküle besetzt. Proteine, die eine Hexahistidinsequenz enthalten, können über die Stickstoffatome der Histidinseitenketten diese Wassermoleküle verdrängen und mit hoher Affinität ( $K_d$  ca.  $10^{-13}$ ) an die Ni<sup>2+</sup>-Ionen binden. Zur Elution werden schließlich Imidazolhaltige Puffer eingesetzt, da Imidazol die Seitenketten von Histidinen kompetitiv verdrängt.

His<sub>6</sub>-tag tragende Proteine wurden dabei entweder über eine FPLC-Anlage (*Amersham Äkta prime plus*) oder über das Batch-Verfahren (mit Gravity Flow Säulen der Firma *Biorad*) gereinigt. In beiden Fällen wurde das Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säulenmaterial (Ni<sup>2+</sup>-NTA Superflow der Firma *Qiagen* oder Ni Sepharose 6 Fast Flow der Firma *GE Healthcare* mit einer

Bindungskapazität von 5-10 mg Protein pro ml Material) zuerst mit 10-12 Säulenvolumen Waschpuffer 1 (50 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazol, pH 8,0) äquilibriert. Das im selben Puffer resuspendierte Zelllysate wurde anschließend auf die Säule geladen. Das Waschen erfolgte nun beim Batchverfahren schrittweise durch Puffer mit steigenden Imidazolkonzentrationen (Waschpuffer 1: 50 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazol, pH 8,0; Waschpuffer 2: wie Puffer 1 nur mit 20 mM Imidazol; Waschpuffer 3: wie Puffer 1 nur mit 40 mM Imidazol). Die Elution erfolgte mit Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0), wobei Protein-haltige Fraktionen mithilfe des Bradford-Tests identifiziert und gesammelt wurden. Im Falle der Proteinreinigung über eine FPLC-Anlage wurde eine Flussrate von 0,5 mL/min verwendet und ein linearer Gradient von 0 % Puffer B bis zu 100 % Puffer B (Puffer A: 50 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazol, pH 8,0; Puffer B: wie Puffer A nur mit 250 mM Imidazol) angelegt. Protein-haltige Fraktionen wurden in diesem Fall über die Absorption bei 280 nm identifiziert.

Für die Reinigung von unlöslichen Proteinen wurde das Zellpellet nach Zellaufschluss in Puffer mit 8 M Harnstoff gelöst und das Protein anschließend über das Batch-Verfahren in den oben beschriebenen, jedoch 8 M Harnstoff-haltigen Puffern mit steigenden Imidazolkonzentrationen gereinigt. In allen Fällen wurde der Verlauf der Reinigung auf einem SDS-PAGE Gel analysiert.

### **3.2.3.2 Proteinreinigung über Amylose-Säulenchromatographie**

Fusionsproteine die das Maltose-bindende Protein (MBP) aus *E. coli* enthielten, wurden über eine Amylose-Säulenchromatographie gereinigt. Da sowohl Maltose als auch Amylose aus  $\alpha(1\rightarrow4)$ -verknüpften Glukoseeinheiten aufgebaut sind, kann das an die Amylose des Säulenmaterials gebundene MBP durch maltosehaltige Puffer wieder eluiert werden. Bei der Expression der entsprechenden Gene wurde dem Wachstumsmedium Glukose zugegeben, um die Produktion der *E. coli* eigenen Amylase zu unterdrücken. Das zu reinigende Proteine wurde gegen Amylose-Säulenpuffer (20 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4) dialysiert und auf die mit dem gleichen Puffer äquilibrierte Säule gegeben. Nach drei Waschschritten konnte das gewünschte Protein durch Elutionspuffer (wie Amylose-Säulenpuffer, nur mit 10 mM Maltose) eluiert werden. Der Reinigungserfolg wurde ebenfalls durch Bradford-Test und SDS-PAGE Gel Analyse untersucht.

### 3.2.3.3 Proteinreinigung über eine Strep-Tactin-Matrix

Auch der *Strep*-tag II wurde für die Affinitätschromatographie verwendet. Dieser tag besteht aus acht Aminosäuren (WSHPQFEK) und bindet mit hoher Affinität an *Strep*-Tactin® Säulenmaterial ( $K_D = 1 \mu\text{M}$ ). *Strep*-Tactin® wurde vom Protein Streptavidin aus *Streptomyces avidinii* abgeleitet und besitzt ähnlich wie Avidin eine sehr hohe Affinität zu Biotin. Durch Zugabe von Desthiobiotin-haltigen Säulenpuffer, wird das *Strep*-tag-Protein kompetitiv verdrängt, da Desthiobiotin eine höhere Affinität zum Säulenmaterial besitzt als der *Strep*-tag.

Die Reinigung der Proteine mit *Strep*-tag erfolgte im Batchverfahren mit Säulen der Firma *Biorad* bei 4°C. Das Säulenmaterial mit einem Bettvolumen von ca. 1 mL *Strep*-Tactin® Sepharose wurde zunächst mit 5 mL Puffer W (100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) äquilibriert [126]. Dann wurde die Proteinlösung aufgetragen und die Säule mehrfach mit Puffer W gewaschen. Die Elution erfolgte danach mithilfe von Puffer E (wie Puffer W, allerdings mit 2,5 mM Desthiobiotin).

### 3.2.3.4 Reinigung von biotinylierten Proteinen über eine monomere Avidinmatrix

Für diese Art der Affinitätschromatographie wurde die Fähigkeit, biotinyliertes Protein durch Immobilisierung an monomerem Avidin zu reinigen, ausgenutzt. Die Affinität von Wildtyp homo-tetrameren Avidin oder Streptavidin zu Biotin ist mit einer Affinitätskonstante von  $K_d = 10^{-15} \text{ M}$  für Reinigungszwecke zu groß. Nur durch denaturierende Elutionsbedingungen wie 8 M Guanidinium Hydrochlorid bei pH 1,5 oder starkes Erhitzen in SDS-Probenpuffer kann diese Bindung gebrochen werden. Für Reinigungszwecke verwendet man daher monomeres Avidin, welches durch das Einführen einer Doppelmutante generiert werden konnte. Dieses besitzt eine deutlich reduzierte Affinitätskonstante von  $K_d \sim 10^{-7} \text{ M}$  und eignet sich somit auch zur Affinitätsreinigung, da hierbei immobilisiertes Protein mit geringen Konzentrationen an Biotin eluiert werden kann. Zu diesem Zweck wurde das Protein nach erfolgter Biotinylierung (s. Abschnitt 3.3.2.2) gegen Avidin-Säulenpuffer (50mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) dialysiert und anschließend auf eine äquilibrierte Soft-Link-Soft-Elute-Säule (*Promega*) gegeben. Anschließend wurde die Säule mit dem 10fachen Säulenvolumen an Avidin-Säulenpuffer gewaschen und das biotinylierte Protein konnte schließlich durch Elutionspuffer (Avidin-Säulenpuffer inklusive 5 mM Biotin) eluiert werden. Auch hier wurde der Reinigungsverlauf auf einem SDS-PAGE Gel analysiert.

### **3.2.3.5 Gelfiltrationschromatographie**

Nach der Modifikationsreaktion der Proteine musste überschüssiges Modifikationsreagenz entfernt werden. Diese Abtrennung erfolgte an einer FPLC-Anlage (Äkta prime plus, *GE Healthcare*) und mithilfe kleiner Gelfiltrationssäulen (Hi-Trap Sephadex G-25 superfine, *Amersham Bioscience*). Dabei wurden die Molekularsiebeigenschaften der mit Epichlorohydrin quervernetzten Dextran-Gelmatrix ausgenutzt, um Moleküle nach ihrer relativen Größe zu trennen. Aufgetragene Proteine eluierten dabei zuerst, während die kleineren Modifikationsreagenzien in die Poren der Gelmatrix eindringen konnten und dadurch länger zurückgehalten wurden. Nach dem Äquilibrieren der Säule mit Puffer (Modifikationspuffer oder Spleißpuffer, siehe die entsprechenden Kapitel), wurde die Probe mit einem maximalen Probenvolumen von 1,5 mL aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei einer Flussrate von 0,5-1 mL/min, wobei der Verlauf der Reinigung durch Absorption bei 280 nm und SDS-PAGE verfolgt wurde.

### **3.2.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration und berechnete molare Extinktionskoeffizienten**

Die Konzentration der gereinigten Enzyme wurde photometrisch (280 nm) unter Berücksichtigung des berechneten molaren Extinktionskoeffizienten ermittelt [127] (Tabelle 3). Die theoretischen Extinktionskoeffizienten wurden unter Verwendung des Programms *Protean* (Lasegene) berechnet.

Tabelle 3: Berechnete molare Extinktionskoeffizienten.

Protein	Theoretischer molarer Extinktionskoeffizient	Proteinmenge [mg/mL] bei A(280nm) = 1
MBP-DnaB <sup>N</sup> -His <sub>6</sub>	78900	0,71
MBP-DnaB <sup>C</sup> -His <sub>6</sub>	71690	0,70
MBP-DnaB <sup>C</sup> -Cys-His <sub>6</sub>	71810	0,70
His <sub>6</sub> -gpD-DnaB <sup>C</sup> -Cys	22310	0,87
Bla-DnaB <sup>N</sup> -His <sub>6</sub>	42300	1,03
Strep-Trx-DnaB <sup>N</sup> -His <sub>6</sub>	34050	0,79
MBP-GyrA <sup>N</sup> -FKBP-His <sub>6</sub>	85540	0,82
MBP-FRB-GyrA <sup>C</sup> -His <sub>6</sub>	99120	0,65
MBP-GyrA <sup>C</sup> -Cys-His <sub>6</sub>	69960	0,76
hGH-GyrA <sup>N</sup> -FKBP-His <sub>6</sub>	37230	1,35
Strep-TycA-GyrA <sup>N</sup> -FKBP-His <sub>6</sub>	163090	0,93
Strep-TycA-GyrA <sup>N</sup> -FKBP	163090	0,93

### 3.3 Biochemische Methoden

#### 3.3.1 Spleißreaktionen

Die Spleißreaktionen wurden bei 25°C in Spleißpuffer (50 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 7,0) durchgeführt, wobei DTT unmittelbar vor der Reaktion frisch zugegeben wurde. Dafür wurde ein Intein-konstrukt in Spleißpuffer vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe des entsprechenden komplementären Intein-fusionsproteins gestartet. Die Endkonzentration der Proteine wurde auf 2 µM eingestellt, sofern nicht anders angegeben. Für die zeitabhängigen Messungen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten eine Probe (30 µL) vom Spleißansatz entnommen, die sogleich durch Zugabe von 10 µL 4x SDS-PAGE Probenpuffer (500 mM Tris/HCl, pH 6,8, 8 % SDS, 40 % Glycerin, 20 % β-Mercaptoethanol, 5 mg/mL Bromphenolblau) gestoppt wurde. Für Temperatur-abhängige Messungen wurden die Int<sup>N</sup>-Konstrukte in Spleißpuffer bei der entsprechenden Temperatur für 5 min vor-inkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe des entsprechenden komplementären Int<sup>C</sup>-Konstruktes gestartet wurde. Die Auswertung der Spleißreaktion

erfolgte durch SDS-PAGE mit Coomassie-Brilliant Blau-Färbung oder durch Visualisierung von Fluorophor-markierten Proteinen auf einem UV-Schirm ( $\lambda_{\text{max}} = 312 \text{ nm}$ ). Die Intensität der Proteinbanden wurde densitometrisch ausgewertet.

### **3.3.2 Modifikationsreaktionen**

Die Modifikationsreaktionen wurden mit den entsprechenden Cys-tag-Proteinen und dem jeweiligen Modifikationsreagenz bei 25°C und vor Licht geschützt durchgeführt. Hierfür wurde das zu modifizierende Protein in Konzentrationen von 5-40  $\mu\text{M}$  eingesetzt, mit dem 10fachen molaren Überschuss an Tris-(2-Carboxyethyl)-Phosphin Hydrochlorid (TCEP) oder der 5fachen molaren Menge an Dithiothreitol (DTT) in Modifikationspuffer (20-50 mM Na-Phosphat, 150 mM NaCl, pH 7,2) versetzt, 15 min lang bei RT inkubiert und anschließend mit einem 10-25fachen molaren Überschuss an Modifikationsreagenz versetzt (in der Regel 25facher Überschuss bezogen auf das Protein). Die Modifikationsreaktionen wurden nach 120 min durch Zugabe von 1 mM (Endkonzentration) DTT, oder dem 0,25fachen Volumen 4x SDS-PAGE Probenpuffer gestoppt.

#### **3.3.2.1 Modifikation mit Fluorescein-5-Maleinimid (FM)**

Für die Modifikation mit Fluorescein-5-Maleinimid (FM) wurde FM in DMF gelöst und anschließend mit Modifikationspuffer auf 1 mM eingestellt (EK 2 % DMF). Nach Reduktion der Proteine wurde FM im 25fachen molaren Überschuss zugegeben und für weitere 2 Stunden bei RT oder 25°C vor Licht geschützt inkubiert.

#### **3.3.2.2 Modifikation mit Maleinimid-PEO<sub>2</sub>-Biotin (BM)**

Für die Modifikation mit BM wurde eine frische 10 mM Stocklösung von BM in Modifikationspuffer hergestellt. Die zu modifizierenden Proteine wurden mit TCEP reduziert und anschließend die 15fache Menge an BM zugegeben und das Reaktionsgemisch für weitere 2 Stunden bei 25°C vor Licht geschützt inkubiert. Anschließend wurde mit 1 mM DTT gestoppt und gegen Avidin-Säulenpuffer (50mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5) dialysiert, um überschüssiges BM abzutrennen. Biotinyliertes Protein wurde daraufhin über eine monomere Avidinmatrix gereinigt (Abschnitt 3.2.3.4).

### 3.3.2.3 Modifikation mit 5-Iodacetamido-Fluorescein (5-IAF)

Für die Modifikation mit 5-IAF wurde das Modifikationsreagenz in DMF gelöst und anschließend mit Modifikationspuffer auf 10 mM eingestellt (Endkonzentration 10 % DMF). Die zu modifizierenden Proteine wurden reduziert und anschließend mit der 25fachen Menge an 5-IAF versetzt und für weitere 2 Stunden bei 20-25°C vor Licht geschützt inkubiert.

### 3.3.2.4 Modifikation mit Polyethylenglykol-5000-Maleinimid (PEG5000)

Die chemische Modifikation des Cys-tags mit O-(2-Maleinimidoethyl)-O'-Methyl-Polyethylenglykol 5000 (PEG5000) fand analog zu den vorher beschriebenen Modifikationsreaktionen statt. Vom Modifikationsreagenz wurde eine 2 mM Stocklösung in Wasser hergestellt. Nach Reduktion des Proteins mit der 10fachen Menge an DTT wurde das PEGylierungsreagenz im 20fachen Überschuss zugegeben und anschließend für 2 Stunden bei 22°C inkubiert. Überschuss an Reagenz wurde durch Zugabe von 2 mM DTT inaktiviert.

## 3.3.3 Herstellung der modifizierten Proteine

### 3.3.3.1 Herstellung von modifizierter $\beta$ -Laktamase

Zur Herstellung von Fluorescein-modifizierter  $\beta$ -Laktamase wurde das unlösliche N-terminale Fusionsprotein (Bla-DnaB<sup>N</sup>-His<sub>6</sub>) aus dem Zellpellet eines *E. coli* Lysats in Puffer mit 8 M Harnstoff gelöst und mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Chromatographie (3.2.3.1) unter denaturierenden Bedingungen gereinigt. Anschließend wurde das Protein durch Dialyse gegen Spleißpuffer mit 2 mM DTT bei 4°C zurückgefaltet. Für eine *trans*-Proteinspleißreaktion wurde nun das zurückgefaltete Protein mit dem komplementären und vorher modifizierten Cys-tag Protein (His<sub>6</sub>-gpD-DnaB<sup>C</sup>-Cys) in einer Konzentration von 8  $\mu$ M und einem Endvolumen von 1 mL gemischt und für 2 Stunden bei 25°C inkubiert. Nach Ablauf der Reaktion wurde der gesamte Reaktionsansatz mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätsmatrix (Ni Sepharose Fast Flow, *GE Healthcare*, 200  $\mu$ L) gemischt, für eine Stunde auf einer Wippe inkubiert und die Suspension anschließend auf eine gravity flow Säule der Firma *Biorad* geladen. Der Durchlauf wurde gesammelt und musste zur weiteren Verwendung ankonzentriert werden (Konzentrationsgefäße, MWCO 5.000 Da, *Sartorius AG*).



### 3.3.3.2 Herstellung von modifiziertem Thioredoxin

Die Reaktion verlief analog zum vorher beschriebenen Verfahren zur Herstellung modifizierter  $\beta$ -Laktamase. N-terminales Fusionsprotein (Strep-Trx-DnaB<sup>N</sup>-His<sub>6</sub>) wurde auch hier denaturierend aus dem Zellpellet eines *E. coli* Zelllysats über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Chromatographie gereinigt und konnte anschließend durch Dialyse gegen Spleißpuffer bei 4°C zurückgefaltet werden. Modifiziertes Thioredoxin konnte dann durch *trans*-Proteinspleißreaktion im präparativen Maßstab und anschließender Reinigung des Spleißproduktes aus dem Durchlauf einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Chromatographie-Säule erhalten werden.

### 3.3.3.3 Herstellung von modifiziertem Wachstumshormon

Zur Herstellung von Fluorescein-modifiziertem menschlichem Wachstumshormon wurde das N-terminale GyrA<sup>N</sup>-Fusionsprotein (hGH-GyrA<sup>N</sup>-FKBP-His<sub>6</sub>) aus dem unlöslichen Zellpellet nach Zellaufschluss in Puffer mit 8 M Harnstoff gelöst und über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Chromatographie denaturierend gereinigt. Anschließend wurde zum denaturierten GyrA<sup>N</sup>-Konstrukt eine berechnete äquimolare Menge (~ 8  $\mu$ M je Protein) des modifizierten Cys-tag-Konstruktes (MBP-GyrA<sup>C</sup>-Cys-His<sub>6</sub>) gegeben und mit Spleißpuffer zu einem Endvolumen von 200  $\mu$ L aufgefüllt. Durch den Verdünnungseffekt durch das native GyrA<sup>C</sup>-Konstrukt, betrug die Harnstoffkonzentration im Endeffekt ca. 6 M. Nach Zugabe von DTT zu einer Endkonzentration von 2 mM wurde der gesamte Reaktionsansatz in einen Dialyseschlauch (MWCO 3.500 Da) überführt. Daraufhin wurde einmal über Nacht und dann noch zweimal für 30 min bei 4°C gegen Spleißpuffer dialysiert. Nach erneutem Pufferwechsel wurde noch mal für 30 min bei RT dialysiert, bevor der Reaktionsansatz aus dem Dialyseschlauch genommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Nach Inkubation für 2h bei 25°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 4x SDS-PAGE Probenpuffer gestoppt und auf einem SDS-PAGE Gel analysiert.

### 3.3.3.4 Herstellung einer modifizierten nicht-ribosomalen Peptidsynthetase

Zur Herstellung der Fluorescein-modifizierten nicht-ribosomalen Peptidsynthetase TycA wurde das N-terminale Fusionsprotein (Strep-TycA-GyrA<sup>N</sup>-FKBP) zunächst aus der löslichen Fraktion eines *E. coli* Zelllysats durch Immobilisierung an Strep-Tactin gereinigt (3.2.3.3). Anschließend wurde das gereinigte Protein mit dem modifizierten Cys-tag-Protein (MBP-GyrA<sup>C</sup>-Cys-His<sub>6</sub>) in einem Volumen von 1 mL und einer Konzentration von 10  $\mu$ M je Protein gemischt und bei 25°C für 12 Stunden inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf

eine  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Säule gegeben (Abschnitt 3.2.3.1). Nach 3 Waschschritten mit  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Waschpuffer mit 5 mM, 20 mM und 40 mM Imidazol wurde mit Elutionspuffer mit 250 mM Imidazol eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden vereinigt, gegen Puffer W (100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) dialysiert und auf eine *Strep*-Tactin-Säule geladen (Abschnitt 3.2.3.3). Gereinigtes modifiziertes Spleißprodukt wurde dabei durch Elution mit Puffer mit Desthiobiotin erhalten und wurde zur weiteren Verwendung gegen Assay-Puffer (50 mM Hepes, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 8,0) dialysiert.

### 3.3.3.5 Proteinmodifikation in einem *E. coli* Zelllysats

Zur Modifikation von ungereinigten Proteinen in einem *E. coli* Zelllysats wurde Fluorescein-markiertes Cys-tag Protein in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zu *E. coli* BL21 (DE3) Zellen gegeben, die das entsprechende komplementäre DnaB<sup>N</sup>-Konstrukt (MBP-DnaB<sup>N</sup>-His<sub>6</sub>) produzierten. Dabei wurde die Reaktion in einem Endvolumen von 100  $\mu\text{L}$  in Gegenwart von 2 mM DTT durchgeführt. Zum Vergleich wurde parallel exakt derselbe Reaktionsansatz gewählt, nur das *E. coli* BL21 (DE3) Zellen verwendet wurden, die kein N-terminales Intein-Konstrukt produzierten (ohne entsprechendes Plasmid). Die Reaktion wurde jeweils sofort bei Zugabe, sowie nach einer Stunde durch Zugabe von 4x SDS-PAGE Probenpuffer gestoppt und auf einem SDS-PAGE Gel analysiert. His<sub>6</sub>-tragende Proteine wurden anschließend durch  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Chromatographie unter Verwendung von kleinen  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Säulen (Ni-NTA spin columns, Qiagen) gereinigt.

### 3.3.4 Enzymatische Assays

#### 3.3.4.1 $\beta$ -Laktamase-Assay

Zur Bestimmung der  $\beta$ -Laktamase-Aktivität wurde die Hydrolyse von Nitrocefin photometrisch bestimmt [128]. Für kinetische Untersuchungen wurde zu diesem Zweck 150 pM Enzyme mit steigenden Nitrocefin-Konzentrationen (10-500  $\mu\text{M}$ ) in Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,0) gemischt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 482 nm und einer Zeitspanne von jeweils 10 min bestimmt. Dabei wurde der theoretische molare Extinktionskoeffizient von hydrolysiertem Nitrocefin von 20500  $\text{cm}^{-1}$  verwendet.

### 3.3.4.2 Thioredoxin-Assay

Thioredoxinaktivität wurde nach einer von Holmgren *et al.* entwickelten Methode bestimmt [129]. Dabei wird die Präzipitation der  $\beta$ -Kette des Insulins durch photometrische Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 650 nm verfolgt. Dazu musste zuerst Insulin in einer Konzentration von 10 mg/mL in Puffer (50 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, pH 7,0) gelöst werden. Durch Ansäuern der Lösung bis zu einem pH-Wert von 2-3 konnte das Insulin vollständig gelöst werden und blieb auch weiterhin in Lösung nachdem der pH-Wert durch Titration auf 8,0 eingestellt wurde. Diese Lösung konnte dann bei -20°C gelagert werden. Insulin (0,1 % (v/v)) und EDTA (2 mM) wurden nun mit Thioredoxin-Protein (10  $\mu$ M) in Puffer (20 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, pH 8,0) gemischt und bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde daraufhin durch Zugabe von DTT (1 mM) in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu$ L gestartet. Negativkontrollreaktionen wurden auf die gleiche Weise durchgeführt, nur dass entweder DTT oder das Thioredoxin-Protein weggelassen wurde.

### 3.3.4.3 Sfp-vermittelte Beladung der PCP-Domäne mit der Phosphopantetheingruppe

Für die post-translationale Modifikation der Enzyme TycA (modifiziert und unmodifiziert) und TycB1 von der apo-Form in die aktive holo-Form wurde jeweils 1  $\mu$ M Enzym mit 100  $\mu$ M CoA und 25 nM Phosphopantetheintransferase Sfp für eine Stunde bei 37°C inkubiert [47]. Die entsprechenden holo-Enzyme konnten dann für den DKP-Produktassay eingesetzt werden. In einer Testreaktion konnte auf die gleiche Weise auch Tetramethylrhodamin-CoA (TMR-CoA) verwendet und die PCP-Domäne von TycA auf diese Weise Fluorescein-modifiziert werden. Dieses konnte allerdings nicht mehr für den DKP-Produktassay eingesetzt werden.

### 3.3.4.4 DKP-assay

Beim DKP-Assay wurde die Bildung des Produktes D-Phe-L-Pro-Diketopiperazin, das durch Zyklisierung des Dipeptids D-Phe-L-Pro gebildet wird, analysiert [130].

Für die DKP-Bildung wurde holo-TycA (500 nM) mit holo-TycB1 (2,25  $\mu$ M) zusammen mit den Substratamino säuren Phenylalanin und Prolin (je 1 mM) und Assay-Puffer (50 mM Hepes, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,0) in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu$ L gemischt und die Reaktion durch Zugabe von ATP (2 mM) gestartet. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für 2 Stunden bei 37°C inkubiert, bevor

die Reaktion durch die Zugabe von 1 mL Methanol gestoppt wurde. Die dadurch ausgefallenen Proteine wurden durch Zentrifugation (13.000 rpm, 15 min) abgetrennt und der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Flüssigkeit wurde durch Gefriertrocknung unter Vakuum entfernt und die Reste daraufhin in 100 µL 30 % (v/v) Methanol gelöst. Die Trennung der Reaktionsprodukte erfolgte durch HPLC über eine EC 150/4,6 Nucleodur C18 Säule (*Macherey & Nagel*) unter Verwendung eines isokratischen Gradienten von 30 % Puffer B bei einer Flussrate von 0,6 mL/min (Puffer A: 0,05 % Ameisensäure/Wasser (v/v) und Puffer B: 0,045 % Ameisensäure/Methanol (v/v)) [131]. DKP-Bildung konnte als Peak bei einer Retentionszeit von ca. 18,7 min durch Detektion bei einer Wellenlänge von 210 nm beobachtet werden. Negativkontrollen wurden unter gleichen Reaktionsbedingungen durchgeführt, indem entweder ATP, eine Substrataminosäure, oder ein Enzym weggelassen wurde.

### 3.4 Analytische Methoden

#### 3.4.1 Densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten

Zur densitometrischen Auswertung der einzelnen Proteinbanden in SDS-PAGE Gelen mussten die entsprechenden Coomassie Brilliant Blau gefärbten Gele zunächst photographiert und mit einem Grafikprogramm bearbeitet werden. Dabei wurden die einzelnen Proteinbanden ausgeschnitten und als neues Bild gespeichert. Analog wurde mit Hintergrundbereichen verfahren. Die auf diese Weise bearbeiteten Proteinbanden und Hintergrundbereiche konnten dann mit dem Programm „Scion Image“ (<http://www.scioncorp.com>) densitometrisch ausgewertet werden. Dabei wird die theoretische Absorption der einzelnen Banden gemessen, indem dunklen Bildbereichen eine große Absorption und weißen Bereichen der Wert Null zugeordnet wird. Auf diese Weise wurde ein Absorptionsprofil erhalten, aus dem durch Integration die Intensitäten der Proteinbanden und Hintergrundbereiche berechnet werden konnten. Dadurch, dass die Ausgangskonzentrationen der einzelnen Proteine bekannt war, konnte die Proteinkonzentration zu jedem Zeitpunkt im Verlauf der *trans*-Proteinspleißreaktion und daraus auch die relative Zu- oder Abnahme der einzelnen Edukte, bzw. Produkte bestimmt werden. Es musste allerdings darauf geachtet werden, dass die Größenunterschiede der untersuchten Proteine nicht zu groß war, da die

Bandenintensitäten im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE Gel sowohl von der Proteinmenge, als auch von der Proteingröße proportional abhängt.

### 3.4.2 Tryptischer Verdau zur Proteinidentifizierung

Zur genauen Analyse einzelner Proteinbanden wurden diese vor der massenspektrometrischen Analyse proteolytisch mit Trypsin verdaut, da kleinere Peptidfragmente deutlich effizienter und genauer identifiziert werden konnten als große Proteine. Zu diesem Zweck wurde die entsprechende Coomassie Brilliant Blau gefärbte Proteinbande eines SDS-PAGE Gels mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 300 µL Waschlösung (200 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  in 50 % Acetonitril) im Thermoschüttler (600 rpm, 30 min, 37°C) entfärbt. Anschließend wurde die Waschlösung entfernt und das Gelstück ca. 30 min lang gefriergetrocknet. Für den Trypsinverdau wurde zum getrockneten Gelstück ca. 10-15 µL Trypsinlösung (0,02 µg/µL Trypsin, 40 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 10 % Acetonitril, pH 8,1) gegeben. Nach 45 min wurden weitere 5 µL Trypsinlösung zugegeben und weitere 15 min inkubiert. Dann wurde der Überstand entfernt und das mit Trypsinlösung getränkte Gelstück wurde über Nacht (16-18h) bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Peptide durch Zugabe von 15 µL Diffusionslösung (10 % MeCN, 1 % TFA) im Ultraschallbad eluiert (45 min, RT) und standen des Weiteren für eine massenspektrometrische Analyse zur Verfügung, wobei einzelne Peptidmassen anhand berechneter Peptidfragmente identifiziert werden konnten (<http://expasy.org/tools/peptide-mass.html>).

### 3.4.3 Analytische HPLC

Durch analytische HPLC (engl. high performance liquid chromatography) können in einem Lösungsmittel gelöste Substanzen getrennt werden. Dabei wird die mobile Phase mit einem Druck von bis zu 400 bar durch eine Chromatographiesäule gepresst. Die stationäre Phase besteht aus Kieselgel, das mit kovalent gebundenen  $\text{C}_{18}$ -Alkylketten beschichtet ist. Diese als reversed phase Chromatographie bezeichnete Trennungsmethode basiert auf der hydrophoben Wechselwirkung des Analyten zu dieser unpolaren stationären Phase. Die Elution erfolgt mit Hilfe eines unpolaren organischen Lösungsmittels, das mit dem adsorbierten Analyten um die Bindungsstelle konkurriert. Als mobile Phase werden meist Mischungen aus Wasser oder Puffer und Acetonitril oder Methanol eingesetzt. Bei isokratischen Trennungen bleibt die Zusammensetzung der mobilen Phase während der gesamten Zeit gleich. Bei Gradiententrennungen wird die Polarität des Fließmittelgemisches während der Analyse

verändert. In dieser Arbeit wurde hauptsächlich eine isokratische Methode mit dem Lösungsmittelgemisch Wasser/Ameisensäure und Methanol/Ameisensäure verwendet. Die Detektion der aufgetrennten Analyten erfolgt über einen UV-Detektor.

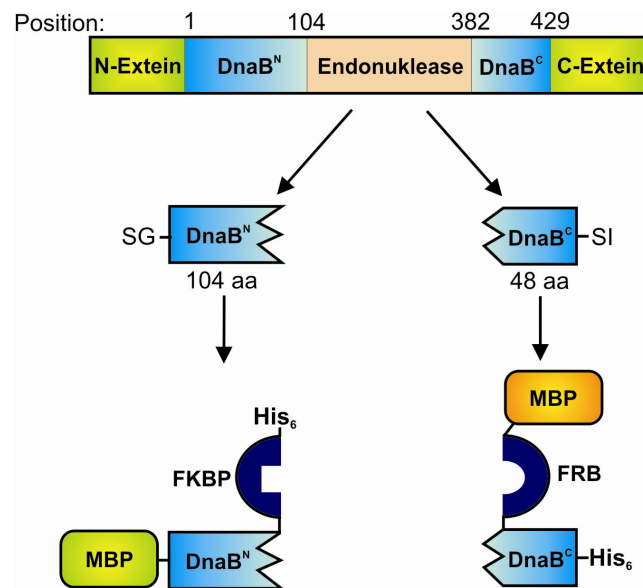
### 3.4.4 Massenspektrometrie

Zur genauen Analyse der einzelnen Reaktionen wurden Modifikations- und Spleißreaktionen in der Regel über ESI-MS (Elektrospray-Ionization-Massenspektrometrie) analysiert, während Peptidfragmente aus Trypsin-Proteolyse durch MALDI-TOF-MS (engl. matrix assisted laser desorption ionization – time of flight) identifiziert wurden. Zu diesem Zweck wurden die Proteinlösungen (100 µL) zunächst mithilfe eines 1100 HPLC-Systems (*Agilent*) unter Verwendung einer 2,1 x 50 mm Zorbax 300SB-C<sub>8</sub>-Säule entsalzt. Molekulare Massen wurden anschließend durch ESI-MS mit einem QStar Pulsar I TOF Massenspektrometer (*Applied Biosystems*) oder durch ESI-FTICR-MS mit einem Finnigan-LTQ-FT Massenspektrometer (*Thermo Electron Group*) bestimmt. Für die MALDI-TOF-MS Analyse der tryptischen Peptidfragmente wurde 1 µL der Peptid-Lösung mit 1 µL einer DHB-Matrix (Dihydroxy-Benzoat) oder CHCA-Matrix ( $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymethylsäure) oder SA-Matrix (Sinapinsäure) gemischt und auf eine Probenplatte aufgetragen. Die ko-kristallisierten Proben wurden mithilfe eines Bruker Autoflex III (Bruker-Daltonics) analysiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ausgangskonstrukte und Einfluss der Heterodimerisierungsdomänen auf die Spleißaktivität des DnaB Inteins

Als Ausgangspunkt für diese Arbeit diente das von Steffen Brenzel künstlich gespaltene DnaB Intein [120]. Das DnaB Intein aus *Synechocystis sp.* strain PCC 6803 ist ein natürliches Maxi-Intein bestehend aus 429 Aminosäuren mit integrierter Endonukleasedomäne. Zur Herstellung eines *trans*-spleißenden Inteins wurden ausschließlich die beiden Spleißbereiche verwendet, die sich N- bzw. C-terminal von dieser Endonukleasedomäne befinden. Diese wurde dadurch entfernt und war nicht in den generierten Konstrukten vorhanden. Zur Herstellung des N-terminalen Fragmentes wurde das Intein an Position 104, nach der Aminosäure Leucin gespalten. Das C-terminale Inteinfragment wurde dementsprechend durch Spaltung an Position 382 nach dem Glutamin erhalten. Zusätzlich wurden noch die beiden natürlichen N- und C-terminalen Exteinaminosäuren beibehalten, um die Funktionalität des Inteins aufrecht zu erhalten. Auf diese Weise wurde ein DnaB<sup>N</sup>-Inteinfragment generiert, welches aus den ersten 104 Aminosäuren des Inteins und den ersten beiden Aminosäuren (Serin und Glycin) des N-Exteins bestand, und ein DnaB<sup>C</sup>-Fragment bestehend aus 48 Aminosäuren plus den beiden natürlichen C-terminalen Exteinresten Serin und Isoleucin. Das Beibehalten des nukleophilen Serins an Position +1 war insofern notwendig, da es für die Spleißreaktion essentiell ist. Desweiteren wurde DnaB<sup>N</sup> mit dem N-Extein MBP fusioniert und für DnaB<sup>C</sup> diente eine Hexahistidinsequenz (His<sub>6</sub>) als C-Extein. Außerdem wurden anstelle der Endonukleasedomäne die beiden Teile des Heterodimerisierungssystems, das FK506-bindende Protein (FKBP) und die FKBP-Rapamycin bindende Domäne (FRB), angefügt. Zur einfachen Proteinreinigung wurden zusätzlich ein His<sub>6</sub>-tag an das N-terminale Konstrukt und MBP an das C-terminale Konstrukt fusioniert. Die beschriebenen Ausgangskonstrukte waren demnach MBP-DnaB<sup>N</sup>-FKBP-His<sub>6</sub> und MBP-FRB-DnaB<sup>C</sup>-His<sub>6</sub> und sind in Abbildung 20 dargestellt.

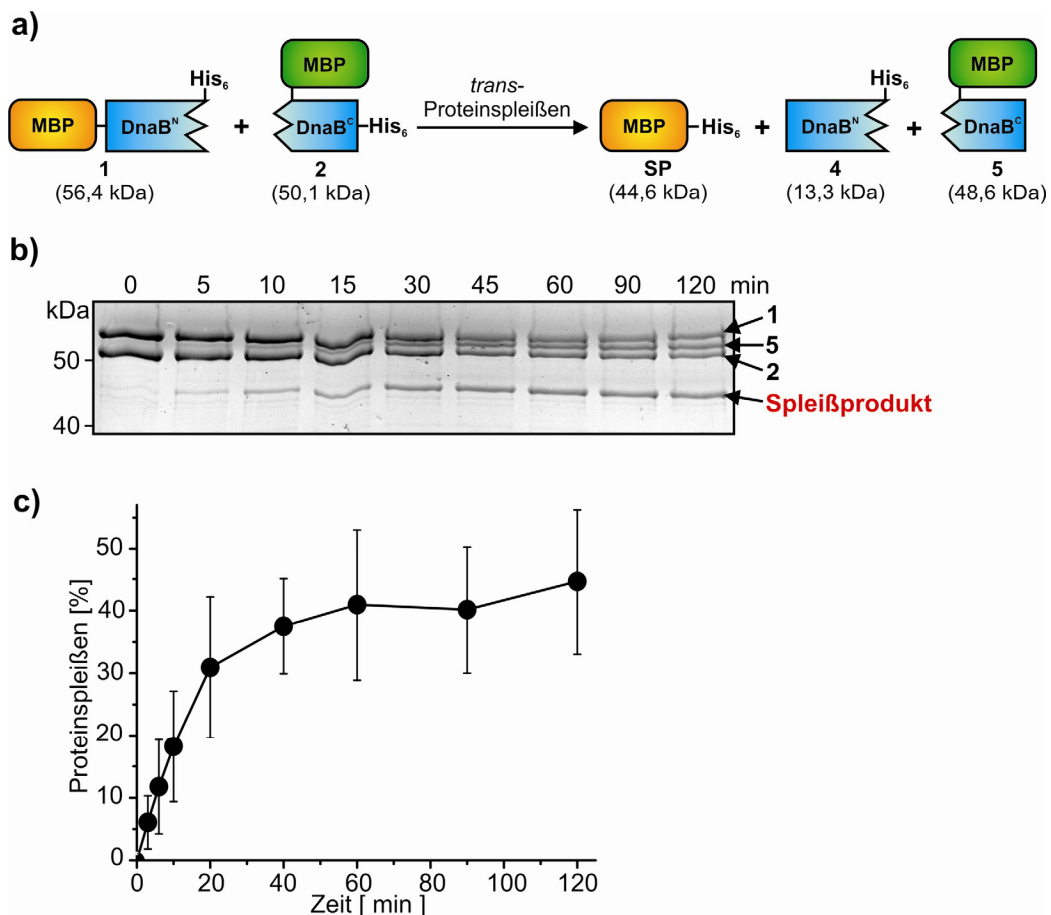


**Abbildung 20: Herstellung des künstlich gespaltenen DnaB Inteins und von S. Brenzel hergestellte Ausgangskonstrukte.** Zur Herstellung eines *trans*-spleißenden Inteins wurde das 104 aa große DnaB<sup>N</sup> mit dem N-Extein MBP und am C-Terminus mit FKBP-His<sub>6</sub> fusioniert. Das 48 aa große DnaB<sup>C</sup> wurde mit dem C-Extein His<sub>6</sub>, sowie zusätzlich am N-Terminus mit MBP-FRB fusioniert. Dabei wurde die Endonukleasedomäne entfernt. Die ersten beiden natürlichen N-Exteinreste (SG) und die ersten beiden C-Exteinaminoaciden (SI) wurden übernommen. Die resultierenden Konstrukte waren demnach MBP-DnaB<sup>N</sup>-FKBP-His<sub>6</sub> und MBP-FRB-DnaB<sup>C</sup>-His<sub>6</sub>.

Beide Konstrukte konnten durch Genexpression in *E. coli* Zellen hergestellt und aus der löslichen Fraktion nach Zellaufschluss mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden. Wurden beide Proteine in gleicher Konzentration miteinander gemischt und bei 25°C inkubiert, konnte Proteinspleißen beobachtet werden. Dies ist besonders erwähnenswert, da das hier verwendete künstlich gesplante *Ssp* DnaB Intein das erste künstlich gesplante Intein war, bei dem kein Denaturierungsschritt mit Harnstoff oder Guanidinium Hydrochlorid mit nachfolgender Rückfaltung für eine Spleißaktivität vonnöten war. Weitere Untersuchungen ergaben außerdem, dass Proteinspleißen auch ohne die Zugabe von Rapamycin beobachtet werden konnte, d.h. die durch Rapamycin induzierte Heterodimerisierung von FKBP und FRB führte zu keiner höheren Ausbeute an Spleißprodukt [120]. Diese Erkenntnis führte dazu, dass im Rahmen dieser Arbeit die beiden Domänen FKBP und FRB auf DNA-Ebene entfernt wurden. Die beiden auf diese Weise erhaltenen Konstrukte MBP-DnaB<sup>N</sup>-His<sub>6</sub> (**1**, 56,4 kDa) und MBP-DnaB<sup>C</sup>-His<sub>6</sub> (**2**, 50,1 kDa) wurden ebenfalls durch Genexpression in *E. coli* Zellen hergestellt und aus der löslichen Fraktion nach Zellaufschluß über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Chromatographie und eine Amylosesäule gereinigt. Für die Spleißreaktion wurden beide Proteine gegen Spleißpuffer dialysiert und in einer Konzentration von 2 µM je Protein zusammen mit 2 mM DTT gemischt und für zwei Stunden bei 25°C inkubiert. Der zeitabhängige Verlauf der Reaktion wurde verfolgt, indem zu bestimmten Zeitpunkten Proben entnommen und diese mit 4x SDS-PAGE Probenpuffer



gemischt und auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen wurden. Wie in Abbildung 21 zu sehen, gingen beide Proteine eine Spleißreaktion miteinander ein, was anhand der zunehmenden Bildung des Spleißproduktes MBP-His<sub>6</sub> (SP, 44,5 kDa) sowie der Abnahme der beiden Edukte MBP-DnaB<sup>N</sup>-His<sub>6</sub> (1) und MBP-DnaB<sup>C</sup>-His<sub>6</sub> (2) beobachtet werden konnte. Die Bande für das Produkt MBP-DnaB<sup>C</sup> (5, 48,6 kDa) entsteht dabei durch Dissoziation des Inteininkomplexes durch die Zugabe von denaturierendem SDS-PAGE Probenpuffer und Erhitzen der Probe auf 95°C. Das ebenfalls entstehende Produkt DnaB<sup>N</sup>-His<sub>6</sub> (4) ist aufgrund der Größe von 13 kDa auf dem in Abb. 21 b) dargestellten SDS-PAGE Gel nicht zu sehen. Das SDS-PAGE Gel aus Abb. 21 b) wurde photographiert und mit Grafikprogrammen bearbeitet, so dass die Banden zur Analyse, wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben, densitometrisch ausgewertet werden konnten. Die graphische Auftragung dieser Auswertung ist in Abb. 21 c) dargestellt. Dabei wurde eine Spleißausbeute von knapp 45 % nach 2 Stunden ermittelt.



**Abbildung 21: Spleißreaktion der DnaB Intein-Konstrukte 1 und 2 ohne das Heterodimerisierungssystem.**  
a) Schematische Darstellung der *trans*-Proteinspleißreaktion der neu hergestellten Konstrukte. b) Zeitlicher Verlauf der Spleißreaktion verfolgt auf einem Coomassie Brilliant Blau gefärbten SDS-PAGE Gel. c) Graphische Auftragung der densitometrisch ermittelten Ausbeuten an Spleißprodukt (SP) im zeitlichen Verlauf.

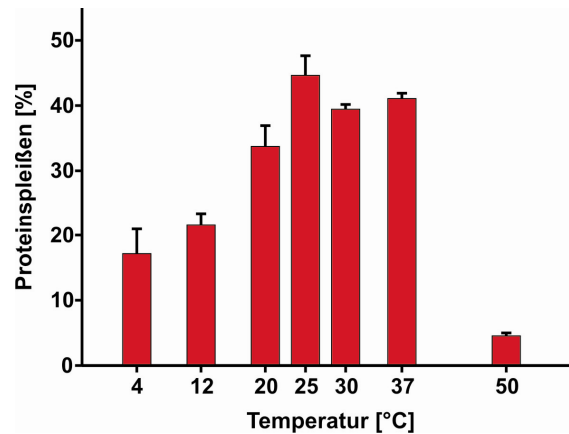
Geht man, wie für die meisten gespaltenen Inteine beschrieben, von dem Modell aus, dass die Assoziation der beiden Inteinfragmente zum aktiven Inteinkomplex sehr schnell verläuft und damit die Inteinfaltung bzw. die *trans*-Proteinspleißreaktion den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellen [95], kann man die Kurve aus Abb. 20 c) einer Funktion erster Ordnung annähern. Die daraus ermittelte Geschwindigkeitskonstante beträgt  $(9,9 \pm 0,8) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  und ist damit fast gleich der für das *Sce* VMA Intein ermittelten Geschwindigkeitskonstante von  $(9,4 \pm 2,0) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  [120] und nur ca. um den Faktor 10 größer als die Geschwindigkeitskonstante für das natürlich gespaltenen *Ssp* DnaE Intein ( $6,6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ) [95].

Ferner wurde das Reaktionsgemisch massenspektrometrisch untersucht. Durch ESI-MS Analyse konnten alle Edukte und Produkte identifiziert werden (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Massenspektrometrische Analyse der Spleißreaktion.**

<b>Protein</b>	<b>Berechnete Masse [Da]</b>	<b>Beobachtete Masse [Da]</b>
MBP-DnaB <sup>N</sup> -His <sub>6</sub>	56408,9	56403
MBP-DnaB <sup>C</sup> -His <sub>6</sub>	50124,3	50127
MBP-His <sub>6</sub>	44612,2	44616
DnaB <sup>N</sup> -His <sub>6</sub>	13323,3	13324
MBP-DnaB <sup>C</sup>	48614,7	48620

Desweiteren wurde die Temperaturabhängigkeit der Reaktion untersucht. Hierfür wurden alle Reaktionspartner (DnaB<sup>N</sup>-Konstrukt, Spleißpuffer, DTT) gemischt und bei der entsprechenden Temperatur vorinkubiert. Nach ca. 5 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe des entsprechenden DnaB<sup>C</sup>-Konstruktes gestartet. Das resultierende Diagramm der prozentualen Spleißausbeuten bei den entsprechenden Temperaturen nach jeweils 4 Stunden ist in Abb. 22 zu sehen.



**Abbildung 22: Temperaturabhängigkeit der *trans*-Proteinspleißreaktion des DnaB Inteins.** Die Ausbeute an Spleißprodukt ist im Temperaturbereich zwischen 20 und 37°C recht ähnlich, wobei der höchste Wert bei 25°C gemessen wurde. Bei tiefen Temperaturen von 12 bzw. 4°C konnten auch noch Ausbeuten von bis zu 17 % ermittelt werden, während bei einer Temperatur von 50°C kein Spleißprodukt mehr nachgewiesen werden konnte (<5 %).

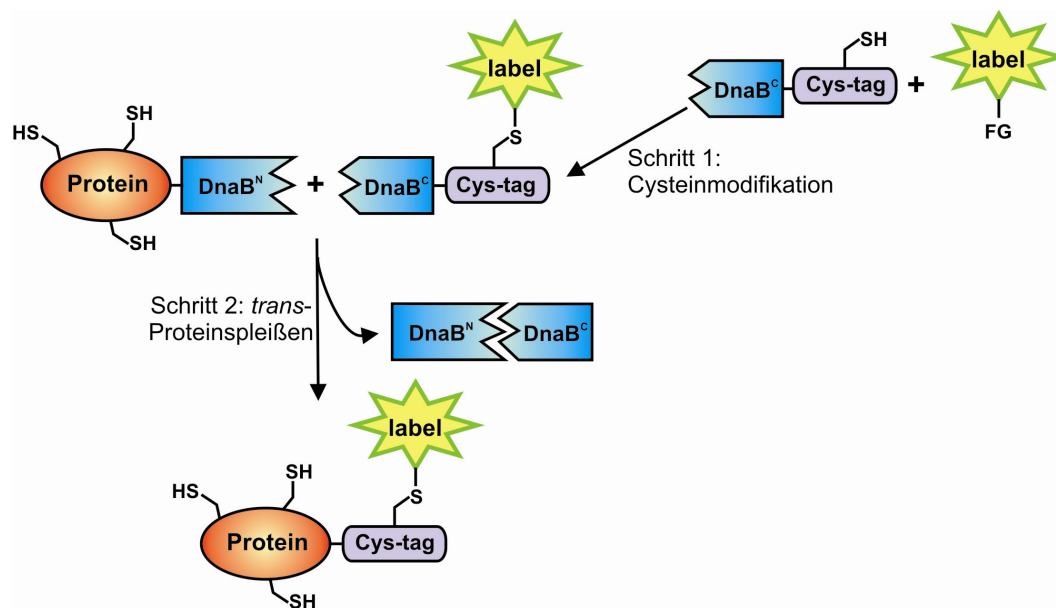
Dem Temperaturprofil der *trans*-Proteinspleißreaktion konnten einige interessante Informationen entnommen werden. Zum Beispiel waren die Ausbeuten der Spleißreaktion im Temperaturbereich von 20 bis 37°C relativ gleich bleibend, wobei der höchste Wert von ca. 45 % bei 25°C erreicht werden konnte. Bei 20 bzw. 30 und 37°C war die Ausbeute an Spleißprodukt etwas geringer und betrug zwischen 35 und 40 %. Ganz erstaunlich war dabei, dass auch bei geringen Temperaturen von bis zu 4°C noch Spleißaktivität beobachtet werden konnte (~17 %), während bei erhöhten Temperaturen von 50°C so gut wie gar kein Proteinspleißen stattfand (< 5 %).

## 4.2 Entwicklung eines zweistufigen Mechanismus zur selektiven Modifikation von Proteinen mittels *trans*-Proteinspleißen

Eine Sequenzanalyse des künstlich gespaltenen DnaB Inteins ergab, dass der 48 Aminosäuren lange C-terminale Teil des DnaB Inteins (DnaB<sup>C</sup>) kein Cysteinrest enthält. Dies ist insofern erstaunlich, da zahlreiche Inteine an Position +1, d.h. als erste Aminosäure des C-Exteins, ein nukleophiles Cystein besitzen, das essentiell für die Spleißaktivität ist. Im Gegensatz dazu besitzt das DnaB Intein ein nukleophiles Serin an dieser Position. Die Verwendung des Cystein-freien MBP führte dazu, dass das gesamte C-terminale DnaB-Konstrukt (MBP-DnaB<sup>C</sup>-His<sub>6</sub>) ebenfalls Cystein-frei war. Diese Tatsache führte zur Idee, einen Cystein-tag, durch das Einbringen eines Cysteinrestes in die C-Exteinsequenz des DnaB<sup>C</sup>-Konstruktes, zu

generieren, um das *trans*-spleißende DnaB Intein für die regioselektive Modifikation von beliebigen Zielproteinen zu nutzen.

Dafür sollte ein Protein bestehend aus dem C-terminalen DnaB Intein und einer kurzen C-terminalen Exteinssequenz mit einem einzigen Cystein durch Genexpression in *E. coli* hergestellt, gereinigt und mit einem beliebigen Thiol-reaktiven Markermolekül modifiziert werden (Schritt 1 in Abb. 23). In einem zweiten Schritt sollte dieser modifizierte Cystein-tag (Cys-tag) mittels *trans*-Proteinspleißen an ein beliebiges Protein, welches als Fusion mit DnaB<sup>N</sup> hergestellt wurde, kovalent gebunden werden. Dieser zweistufige Mechanismus erlaubt auch die selektive C-terminale Modifikation von Cystein-haltigen Proteinen mit einfachen Thiol-reaktiven Substanzen und ist in Abbildung 23 gezeigt.



**Abbildung 23: Zweistufiger Mechanismus zur selektiven Modifikation von Proteinen mittels Proteinspleißen in *trans*.** Im ersten Schritt wird ein einzelnes Cystein im Extein eines Int<sup>C</sup>-Konstruktes (Cys-tag) mit einem Marker, der eine Thiol-reaktive funktionelle Gruppe (FG) trägt, modifiziert. Dieser modifizierte Cys-tag wird in einem zweiten Schritt durch *trans*-Proteinspleißen mit einer nativen Peptidbindung an ein beliebiges Protein kovalent gebunden. Dieses Protein kann dabei beliebig viele Cysteine besitzen und wird als Fusion mit einem Int<sup>N</sup>-Konstrukt hergestellt.

#### 4.2.1 Einfluss des Cysteinrestes in der C-terminalen Exteinssequenz des Ssp DnaB Inteins

Nachdem das neue Cystein durch molekularbiologische Methoden in die C-Exteinssequenz des DnaB-Inteins eingeführt wurde, sollte zunächst gezeigt werden, dass dieses zusätzliche Nukleophil in einer Proteinspleißreaktion toleriert wird. Außerdem musste die Zugänglichkeit und Reaktivität des Cys-tags gegenüber diversen Modifikationsreagenzien überprüft werden. Das einzelne Cystein wurde auf zwei verschiedene Weisen in die C-Exteinssequenz (SIRSRSH<sub>6</sub>) des vorher beschriebenen DnaB<sup>C</sup>-Konstruktes eingeführt (siehe Abschnitt 3.1.1

für Details). Einerseits wurden die Aminosäuren Arginin und Serin durch Cystein und Glycin mittels einer Punktmutations-PCR ausgetauscht und dadurch die C-Exteinsequenz SIRSCGH<sub>6</sub> erhalten. Andererseits wurde eine zweite Sequenz (SIEQGGRSH<sub>6</sub>) mittels PCR erhalten, in der noch zwei zusätzliche Aminosäuren der natürlichen Exteinsequenz (SIEQ) enthalten waren. Da beide Cysteinsequenzen in folgenden Studien gleichwertig waren, wurde im Folgenden nur noch die erste Variante im Konstrukt MBP-DnaB<sup>C</sup>-Cys-tag (Cys-tag-Sequenz: SIRSCGH<sub>6</sub>) verwendet. In ersten Versuchen wurde der Einfluss der veränderten Exteinsequenz auf das Spleißverhalten des DnaB Inteins untersucht. Dazu wurde wie oben beschrieben der zeitabhängige Verlauf der Spleißreaktion auf einem SDS-PAGE Gel verfolgt und anschließend densitometrisch ausgewertet. Ein Vergleich der beiden Reaktionen mit und ohne Cystein zeigte demzufolge einen sehr ähnlichen Reaktionsverlauf. In der graphischen Auftragung zeigten die neuen Cys-tag Konstrukte eine etwas geringere Anfangssteigung, dafür aber eine etwas höhere Ausbeute nach zwei Stunden (siehe schwarze Kurve in Abb. 26c). Eine Angleichung an eine Funktion erster Ordnung lieferte eine Geschwindigkeitskonstante von  $(5,5 \pm 0,4) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . Somit konnte gezeigt werden, dass die leicht veränderte C-Exteinsequenz mit einer weiteren nukleophilen Seitenkette in der Nähe des essentiellen Serins an Position +1 keineswegs zur Inhibition der Spleißreaktion führte, sondern nur einen geringen Einfluss auf die Spleißaktivität ausübte.

### **4.3 Cysteinmodifikationen des DnaB<sup>C</sup>-Konstruktes & Proteinspleißreaktionen der modifizierten Cys-tag-Proteine**

Eine wichtige Voraussetzung zur selektiven Modifikation des Cys-tag Konstruktes war, dass die eingesetzten Reagenzien ausschließlich mit der Thiolgruppe des eingeführten Cysteins reagierten und möglichst unreaktiv gegenüber allen anderen nukleophilen Seitenketten, insbesondere gegenüber anderen Amingruppen waren. Daher wurden ausschließlich die reaktiven Iodacetamide und die etwas selektiveren Maleinimide verwendet. Die Maleinimidgruppe gehört dabei zu den selektiveren Reagenzien, da sie gegenüber einer freien Thiolgruppe bei pH 7,0 ca. 1000mal reaktiver ist, als gegenüber einem Amin und weitgehend unreaktiv gegenüber allen anderen Seitenketten. Allerdings ist diese Selektivität strikt pH-abhängig und gilt überwiegend für den pH-Bereich von 6,5-7,5. Auch die Iodacetamidgruppe weist eine ausreichende Selektivität in diesem pH-Bereich aus, da die meisten aliphatischen Amine bei pH-Werten < 8 in der protonierten Form vorliegen und somit relativ unreaktiv

sind. Aus diesem Grund wurden die verschiedenen Modifikationsreaktionen auch in Phosphatpuffer bei pH 7,2 oder alternativ in Spleißpuffer bei pH 7,0 durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.3.2). Eine Auswahl der verwendeten Maleinimid- und Iodacetamid-Modifikationsreagenzien ist in Abb. 24 dargestellt. Hierbei wurden vor allem Fluorophore, aber auch Biotinylierungs- und PEGylierungsreagenzien verwendet.

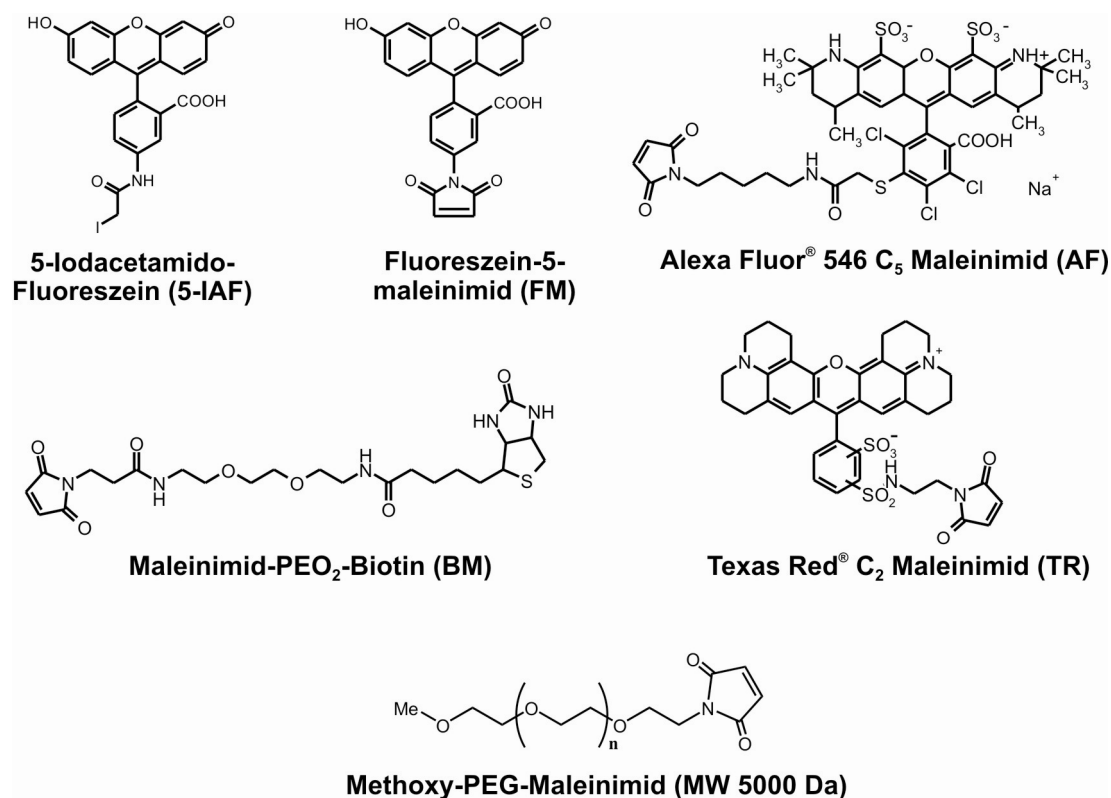


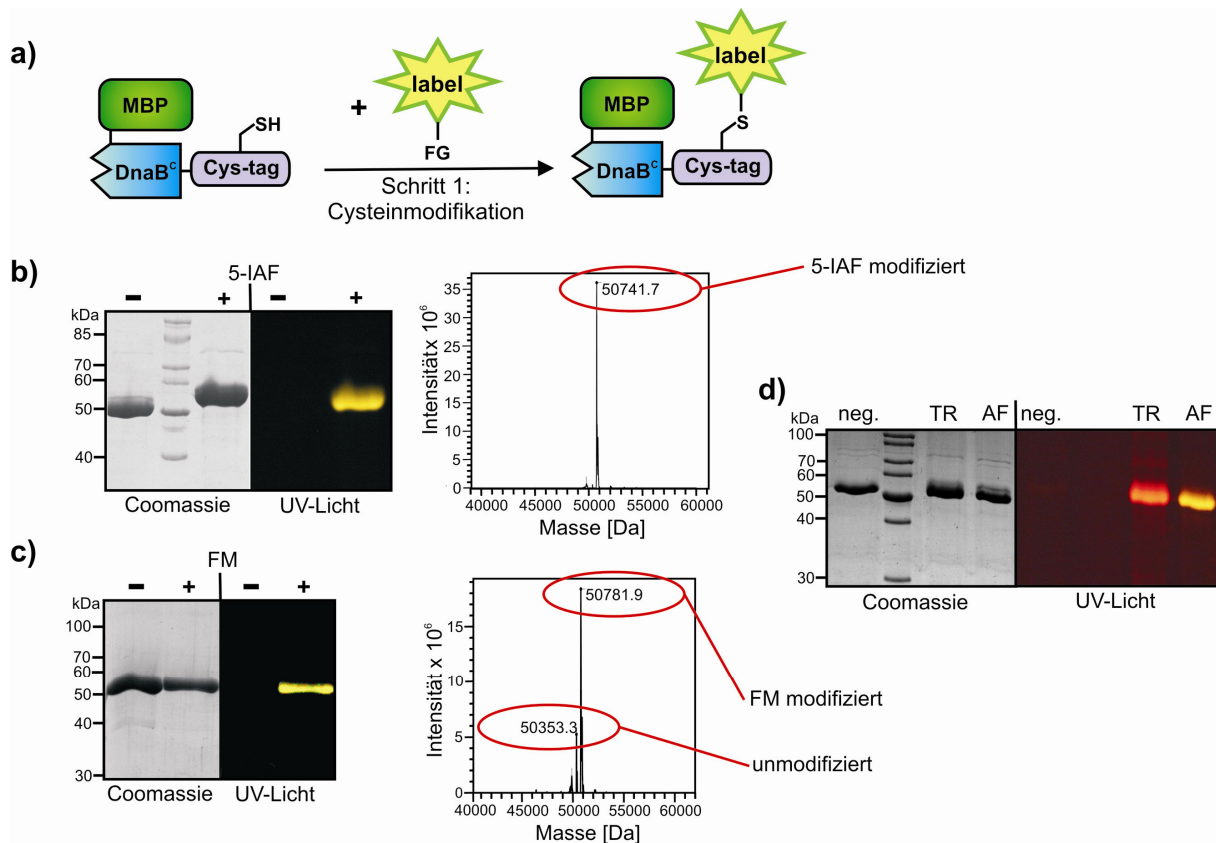
Abbildung 24: Chemische Strukturen der verwendeten Modifikationsreagenzien.

Zuerst wurde die Zugänglichkeit des Cysteins für die verschiedenen Modifikationsreagenzien und dessen Aktivität in einzelnen Modifikationsreaktionen untersucht. Dazu wurden die Cys-tag Konstrukte zuerst mit TCEP und/oder DTT reduziert, um eventuell vorhandene intermolekulare Disulfidbrücken zu spalten. Anschließend wurde mit einem Überschuss an Modifikationsreagenz für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei zeigte sich die Reaktion relativ unabhängig von der Menge an Reagenz solange mindestens ein 5facher molarer Überschuss (bezogen auf das Reduktionsmittel) eingesetzt wurde. Eine zeitabhängige Analyse der Reaktion zeigte zudem, dass die Reaktion schon nach einer Minute so gut wie vollständig abgelaufen war. Entscheidend war in diesem Zusammenhang allerdings die Reduktion mit TCEP oder DTT vor Zugabe des Modifikationsreagenz. Ohne Reduktionsmittel kam es zu einer deutlich verringerten Bildung des Modifikationsprodukts. Erst die Reduktion mit der mindestens 2fachen molaren Menge an

TCEP oder DTT (bezogen auf das Protein) führte zum gewünschten Produkt, wobei DTT dabei die besseren reduktiven Eigenschaften aufwies und aus diesem Grund auch bevorzugt eingesetzt wurde. Im folgenden Abschnitt soll nun als erstes auf die Modifikation mit Fluorophoren eingegangen werden.

### 4.3.1 Cysteinbiokonjugation mit Fluorophoren

Als erstes wurde die Modifikation des Cys-tag Konstruktes (MBP-DnaB<sup>C</sup>-Cys) mit Fluorophoren ausführlich untersucht (Abb. 25a). Dies war besonders vorteilhaft, da hierbei ein erfolgreicher Einbau des Fluorophors durch UV-Anregung und anschließender Detektion der fluoreszierenden Bande im SDS-PAGE Gel einfach verfolgt und analysiert werden konnte. Als erstes wurde Fluorescein-5-Maleinimid (FM) verwendet, das ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 491 nm besitzt. Dieses Reagenz ist durch die Maleinimidgruppe ausreichend selektiv für die Markierung von Thiolen. Zur selektiven Modifikation wurde das Cys-tag Protein reduziert und anschließend mit dem 25fachen Überschuss an FM für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. (Das FM lag dabei als 1 mM Lösung vor, vgl. Abschnitt 3.3.2.1). Danach wurde die Modifikationsreaktion mit der 100fachen Menge an DTT gestoppt, um überschüssiges Reagenz zu eliminieren. Eine Probe vor und nach der Reaktion wurde mit 4x SDS-PAGE Probenpuffer gemischt und nach dem Erhitzen auf 95°C auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen. Vor dem Färben mit Coomassie Brilliant Blau wurde das Gel unter UV-Licht photographiert, wodurch die Bildung des modifizierten Cys-tag Proteins MBP-DnaB<sup>C</sup>-Cys(FM) nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 25 c). Die Modifikation mit 5-Iodacetamid-Fluorescein (5-IAF) verlief ganz analog, nur dass eine 10 mM Lösung von 5-IAF verwendet wurde (vgl. 3.3.2.3). Auch hier wurde die Reaktion für zwei Stunden bei RT durchgeführt und anschließend durch SDS-PAGE unter UV-Licht und mit Coomassie-Anfärbung analysiert. Dabei war ebenfalls das Auftreten einer fluoreszierenden Bande zu erkennen, die auf das Modifikationsprodukt MBP-DnaB<sup>C</sup>-Cys(IAF) zurückgeführt werden konnte (Abb. 25 b). Auch die Modifikationsreaktionen mit Texas Red C2 Maleinimid (TR) und Alexa Fluor 546 C5 Maleinimid verliefen nach demselben Schema. Alle Modifikationsreaktionen sind in Abb. 25 dargestellt.



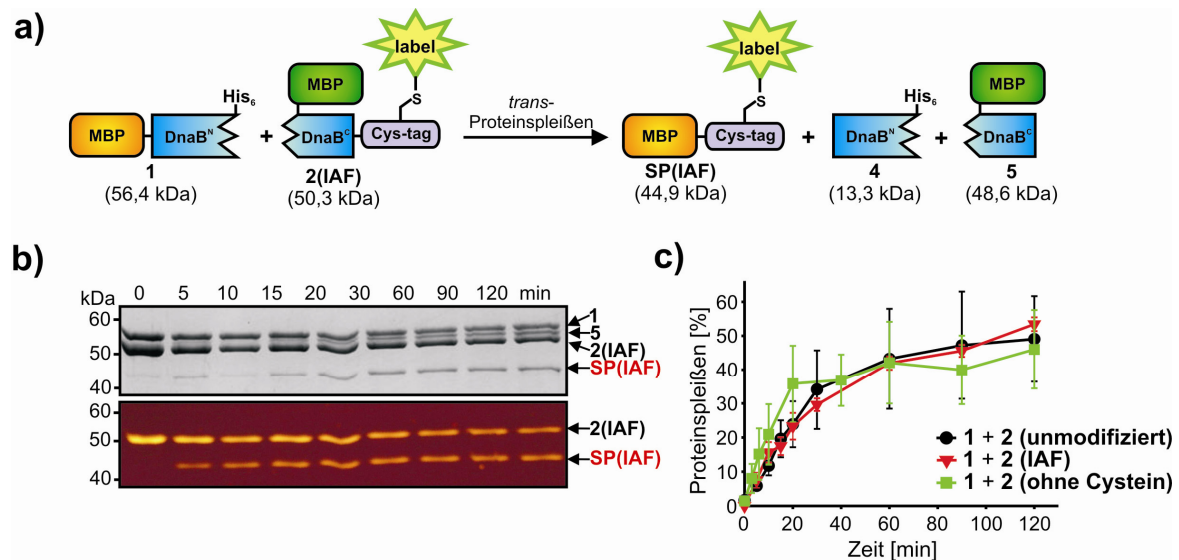
**Abbildung 25: Cysteinmodifikation mit diversen Fluorophoren.** a) Schematische Darstellung der Modifikation des Cys-tag Konstruktes. Coomassie Brilliant Blau gefärbtes und unter UV-Licht photographiertes SDS-PAGE Gel, sowie massenspektrometrische Analyse der Modifikation mit 5-Iodacetamid-Fluorescein (5-IAF, b), sowie der Reaktion mit Fluorescein-5-Maleinimid (FM, c) und SDS-PAGE Gel der mit Texas Red C2 Maleinimid (TR) und Alexa Fluor 546 C5 Maleinimid (AF) modifizierten Proteine (d). Ein Cystein-freies Kontrollprotein wurde unter den gleichen Reaktionsbedingungen mit FM nicht modifiziert (neg.).

Die Reaktionen mit FM und 5-IAF wurden ferner mithilfe der Massenspektrometrie untersucht. Dabei konnte der Befund aus den SDS-PAGE Gelen, dass die Reaktion nur in Gegenwart von TCEP oder DTT stattfindet, bestätigt werden. Ohne vorherige Reduktion, konnte durch ESI-MS-Analyse fast ausschließlich nur unmodifiziertes Ausgangsprotein gefunden werden. Außerdem wurde bei der Reaktion mit FM noch unmodifiziertes Edukt gefunden (FM modifiziert: berechnet  $[M]^+ = 50781,52$  Da, beobachtet  $[M]^+ = 50781,9$  Da; unmodifiziert: berechnet  $[M]^+ = 50354,52$  Da, beobachtet  $[M]^+ = 50353,3$  Da, Abb. 25 c), während mit 5-IAF ausschließlich modifiziertes Protein gefunden wurde (berechnet  $[M]^+ = 50742,88$  Da, beobachtet  $[M]^+ = 50741,7$  Da, Abb. 25 b). Die Analyse der massenspektrometrischen Daten lässt zwar im Prinzip keine quantitativen Aussagen zu, aber da in beiden Fällen identische Ausgangsproteine verwendet wurden, sollten sie auch in gleicher Weise detektiert werden können. Somit kann zumindest abgeleitet werden, dass die Reaktion mit FM nicht vollständig ablief, was zum einen daran gelegen haben könnte, dass das Iodacetamidderivat reaktiver war und dadurch vollständiger mit dem Cys-tag Protein reagieren konnte. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass auch die Reaktion mit 5-IAF



nicht vollständig ablief, aber das dabei unmodifizierte Ausgangsprotein nicht detektiert werden konnte. Dagegen spricht allerdings auch das Coomassie gefärbte SDS-PAGE Gel, weil darin nach der Modifikation kein Ausgangsmaterial mehr beobachtet werden konnte. Ein weiteres wichtiges Ergebnis war, dass nur einfach modifiziertes Protein gefunden wurde. Dies deutete darauf hin, dass beide Reaktionen ausreichend selektiv waren und die Proteine exklusiv am einzigen Cystein modifiziert wurden. Der endgültige Beweis, dass die Modifikationsreaktion tatsächlich am Cystein des Cys-tags stattfand und nicht an einer anderen nukleophilen Seitenkette, konnte schließlich anhand von Negativkontrollen mit dem Cystein-freien Vorgängerprotein MBP-DnaB<sup>C</sup>-His<sub>6</sub> (Exteinsequenz: SIRSRS<sub>6</sub>) erbracht werden. Dieses Protein unterscheidet sich nur in zwei Aminosäuren vom Cys-tag Protein (RSRS statt RSCG) und wurde in Kontrollreaktionen, die unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, mit denselben Reagenzien nicht modifiziert (für die Reaktion des Cystein-freien Kontrollproteins mit FM siehe Abb. 25 d).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das Cys-tag Konstrukt chemoselektiv am einzigen Cystein modifiziert wurden, sollte als nächstes die Funktionsfähigkeit des modifizierten Intein-Konstruktes in einer Spleißreaktion nachgewiesen werden. Dabei stellte sich die Frage, inwieweit sich angebrachte Fluorophore störend auf die Interaktion der beiden Inteinhälften, oder auf einzelne Schritte der Proteinspleißreaktion auswirken. Dazu wurde, von den vorher beschriebenen Cys-tag Proteinen, überschüssiges Modifikationsreagenz zunächst durch Gelfiltration abgetrennt. Das auf diese Weise gereinigte C-terminale Cys-tag Konstrukt konnte nun in einer *trans*-Proteinspleißreaktion eingesetzt werden. Dazu wurde es mit dem N-terminalen DnaB-Konstrukt in einer Konzentration von 2 µM in Spleißpuffer gemischt und bei 25°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben genommen, mit 4x SDS PAGE Probenpuffer gemischt und nach Kochen bei 95°C auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen. Da bei allen modifizierten Proteinen eine Spleißreaktion zu beobachten war, soll hier exemplarisch nur auf die Reaktion des mit 5-IAF modifizierten Proteins eingegangen werden. Die Reaktion der beiden Proteine MBP-DnaB<sup>N</sup>-His<sub>6</sub> (**1**) und MBP-DnaB<sup>C</sup>-Cys(IAF) **2(IAF)** wurde, wie für das unmodifizierte Protein weiter oben beschrieben, zeitabhängig untersucht. Der Reaktionsverlauf, sowie die graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung sind in Abb. 26 dargestellt.



**Abbildung 26:** Analyse der *trans*-Proteinspleißreaktion des Fluorescein-modifizierten Cys-tag Konstruktes. a) schematische Darstellung der Reaktion. b) Coomassie Brilliant Blau gefärbtes (oben) und unter UV-Licht photographiertes (unten) SDS-PAGE Gel des zeitlichen Reaktionsverlaufs. Dabei ist die Zunahme der Spleißproduktbande **SP(IAF)** und die Abnahme der Eduktbande **2(IAF)** deutlich erkennbar. c) Densitometrische Auswertung des Reaktionsverlaufs des modifizierten Cys-tag Konstruktes (rot) und Vergleich mit dem Reaktionsverlauf von unmodifiziertem Protein (schwarz) und Cystein-freiem Vorgängerprotein (grün) (vgl. Abb. 21).

Der zeitliche Reaktionsfortschritt kann besonders gut anhand des Fluoreszenzgeles veranschaulicht werden. Darin erkennt man die zeitliche Abnahme der Bandenintensität des fluoreszierenden Ausgangsmaterials **2(IAF)**, während eine neue fluoreszierende Bande auf der Höhe des zu erwartenden Spleißproduktes **SP(IAF)** (MBP-Cys-tag(IAF), 44,9 kDa) entsteht und mit der Zeit deutlich zunimmt. Die Eduktbande vom N-terminalen Fusionsprotein (**1**) und die Produktbande von MBP-DnaB<sup>C</sup> (**5**) sind in diesem Fall nur im oberen Coomassie-gefärbten SDS-PAGE Gel (Abb. 26 b) zu sehen, da beide Proteine kein Fluorophor tragen. Die densitometrische Auswertung dieser Reaktion ist in Abb. 26 c) in rot dargestellt. Als Vergleich ist darin weiterhin die Kurve des Reaktionsverlaufs derselben Reaktion ohne Modifikation, wie weiter oben beschrieben, dargestellt. Zur besseren Übersicht ist auch die Kurve aus Abb. 21 der *trans*-Proteinspleißreaktion desselben N-terminalen DnaB Konstruktes mit dem Cystein-freien C-terminalen Konstrukt zu sehen. Wie schon für die unmodifizierte Variante beschrieben, verlaufen alle Reaktionen sehr ähnlich, wobei die beiden Reaktionen des unmodifizierten und modifizierten Cys-tag Konstruktes kaum voneinander zu unterscheiden sind. Für die Reaktion von **1** mit **2(IAF)** konnte eine Geschwindigkeitskonstante von  $(4,7 \pm 0,4) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  ermittelt werden. Eine Zusammenstellung der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten im Vergleich zum künstlich gespaltenen *Sce* VMA Intein [120], sowie zum natürlich *trans*-spleißenden *Ssp* DnaE Intein [95] findet sich in Tabelle 5.

Tabelle 5: Ermittelte Geschwindigkeitskonstanten und Vergleich zu anderen gespaltenen Inteinen.

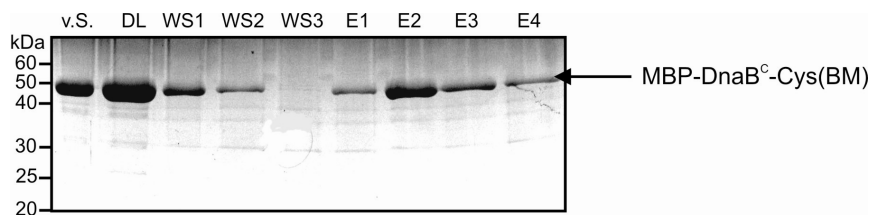
Reaktion	Geschwindigkeitskonstante [s <sup>-1</sup> ]
<i>Ssp</i> DnaB Intein (ohne Cystein)	$(9,9 \pm 0,8) \times 10^{-4}$
<i>Ssp</i> DnaB Intein (mit Cys-tag)	$(5,5 \pm 0,4) \times 10^{-4}$
<i>Ssp</i> DnaB Intein (Cys(IAF))	$(4,7 \pm 0,4) \times 10^{-4}$
<i>Sce</i> VMA Intein	$(9,4 \pm 2,0) \times 10^{-4}$
<i>Ssp</i> DnaE Intein	$(6,6 \pm 1,3) \times 10^{-5}$

Der Beweis, dass es sich tatsächlich um modifiziertes Spleißprodukt handelt, konnte schließlich durch ESI-MS Analyse des gesamten Reaktionsansatzes erbracht werden. Dabei konnte die Masse des einfach modifizierten Spleißproduktes eindeutig identifiziert werden (berechnete Masse:  $[M]^+ = 44917,8$  Da, beobachtete Masse:  $[M]^+ = 44917,5$ ). Dieses Ergebnis deutete ebenfalls darauf hin, dass die davor beschriebene Modifikationsreaktion tatsächlich chemoselektiv am Cystein des Cys-tags stattfand und nicht an anderer Stelle, da nur dieser C-Exteinteil des Proteins durch *trans*-Proteinspleißen auf das N-Extein übertragen wird. Durch eine Modifikation an anderer Stelle wäre zwar das Cys-tag Protein auch fluoreszierend, jedoch nicht das Spleißprodukt. Auch die Modifikation einer anderen Aminosäureseitenkette des Cys-tags konnte damit so gut wie ausgeschlossen werden, da nur einfach modifiziertes Protein gefunden wurde und die Reaktion mit dem Cystein-freien DnaB<sup>C</sup>-Konstrukt kein modifiziertes Produkt lieferte. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ausbeute und Geschwindigkeit der Proteinspleißreaktion durch die Verwendung eines modifizierten Cys-tag Proteins nicht beeinträchtigt wurde.

#### 4.3.2 Proteinbiotinylierung durch Cys-tag Modifikation

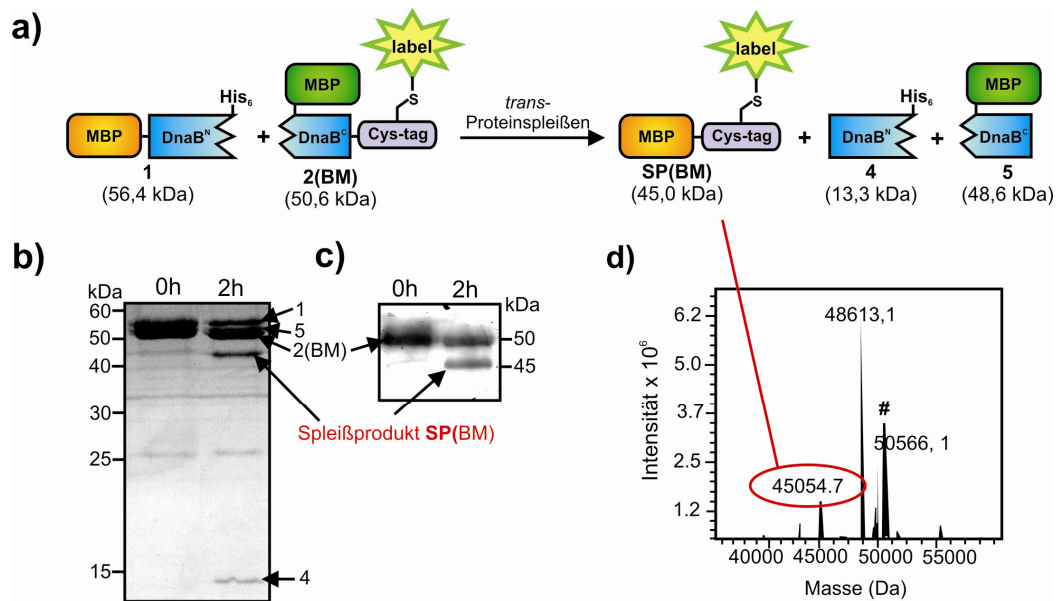
Nachdem gezeigt werden konnte, dass das Cys-tag Konstrukt MBP-DnaB<sup>C</sup>-Cys chemoselektiv mit verschiedenen Fluorophoren modifiziert werden konnte und das dieser modifizierte Cys-tag anschließend regioselektiv auf ein Protein durch *trans*-Proteinspleißen übertragen werden konnte, sollte nun überprüft werden, ob auch andere funktionelle Gruppen, wie z.B. Affinitätsmarker für diesen Ansatz verwendet werden können. Zu diesem Zweck wurde das Cys-tag Protein (MBP-DnaB<sup>C</sup>-Cys) mit einem Biotin-Maleinimid-Reagenz (siehe Abb. 24) modifiziert. Dabei konnte ausgenutzt werden, dass biotinyliertes Protein durch Immobilisierung an monomerem Avidin gereinigt werden konnte. Die Affinität von Wildtyp homo-tetrameren Avidin oder Streptavidin zu Biotin ist mit einer Affinitätskonstante von

$K_d = 10^{-15}$  M zu groß, als dass es für Reinigungszwecke ausgenutzt werden könnte. Denn nur durch denaturierende Elutionsbedingungen wie 8 M Guanidinium Hydrochlorid bei pH 1,5 oder starkes Erhitzen in SDS-PAGE Probenpuffer kann diese nicht-kovalente Bindung gebrochen werden. Für Reinigungszwecke wurde deshalb monomeres Avidin genutzt (*Promega*), welches als Doppelmutante des Wildtyp-Avidins generiert werden konnte. Dieses besitzt eine deutlich reduzierte Affinitätskonstante von  $K_d \sim 10^{-7}$  M und eignet sich somit auch zur Affinitätsreinigung, da hierbei immobilisiertes Protein mit geringen Konzentrationen an Biotin eluiert werden kann. In diesem Fall wurde reduziertes Cys-tag Protein mit der 25fachen molaren Menge an Biotin-PEG<sub>2</sub>-Maleinimid (BM) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf eine monomere Avidinmatrix geladen (Abschnitt 3.2.3.4). Die große Menge an Protein im Durchlauf der Säule (DL in Abb. 27) war dabei nicht unbedingt auf große Mengen an unmodifiziertem Protein zurückzuführen, sondern lag vermutlich eher in der zu geringen Bindekapazität der Säule, so dass auch biotinyliertes Protein darin enthalten ist. Nach drei Waschschritten konnte sauberes biotinyliertes Protein durch Puffer mit 2 mM Biotin eluiert werden. Die Reinigung ist in Abb. 27 dargestellt.



**Abbildung 27: Reinigung des biotinylierten Cys-tag Proteins über eine monomere Avidinmatrix.** Der Modifikationsansatz (vor Säule, v.S.) wurde auf die monomere Avidinmatrix geladen. Nicht-biotinyliertes Protein konnte dadurch im Durchlauf (DL) und in den folgenden drei Waschschritten (WS) abgetrennt werden. Biotinyliertes Cys-tag Protein wurde dann mit Elutionspuffer mit 2 mM Biotin in Elutionsfraktionen (E1-E4) aufgefangen.

Durch ESI-MS Massenspektrometrie konnte die erfolgreiche Modifikation und Reinigung gezeigt werden (berechnete Masse  $[M]^+ = 50565,8$  Da, beobachtete Masse  $[M]^+ = 50566,1$  Da). Das auf diese Weise hergestellte biotinylierte Cys-tag Protein MBP-DnaB<sup>C</sup>-Cys(BM), **2(BM)** wurde anschließend gegen Spleißpuffer dialysiert und in einer Spleißreaktion mit dem entsprechenden komplementären DnaB<sup>N</sup>-Konstrukt (**1**) eingesetzt (Abb. 28 a). Proben vor und nach der Reaktion wurden auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen und durch Coomassie Brilliant Blau Anfärbung analysiert (Abb. 28 b). Außerdem wurde die Produktbildung durch einen Western Blot mit Streptavidin HRP (Abb. 28 c), sowie durch massenspektrometrische Untersuchungen (Abb. 28 d) nachgewiesen.



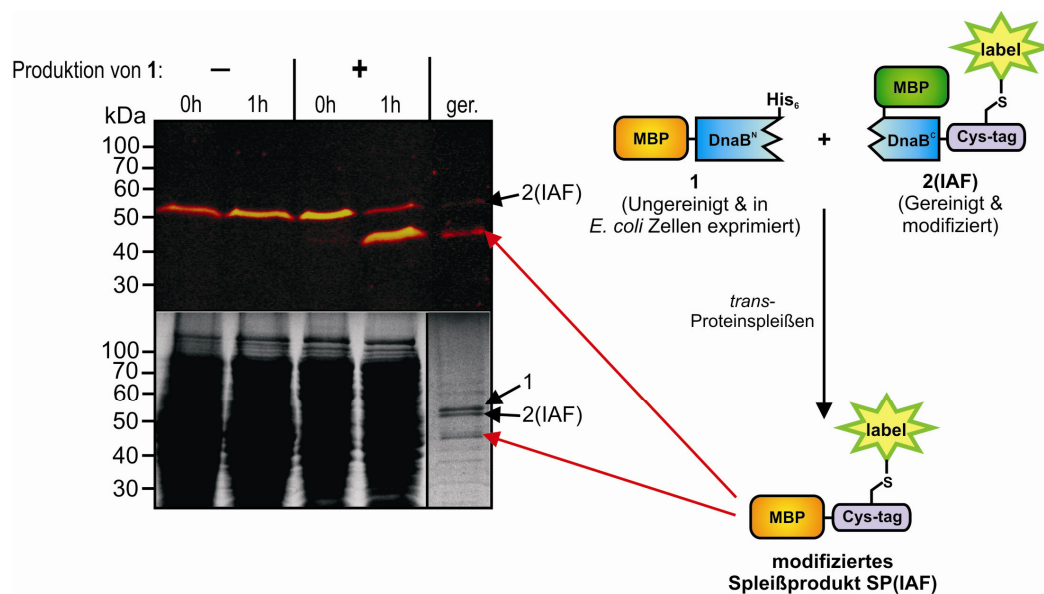
**Abbildung 28: Proteinbiotinylierung durch *trans*-Proteinspleißen.** a) Schematische Darstellung der Spleißreaktion zur Herstellung des regioselektiv biotinylierten Spleißproduktes **SP(BM)**. b) Coomassie Brilliant Blau gefärbtes SDS-PAGE Gel der Reaktion nach 0 und 2h, sowie c) Western Blot mit Streptavidin-HRP derselben Reaktion. d) Die massenspektrometrische Analyse zeigte die Bildung von einfach biotinyliertem Spleißprodukt (berechnete Masse  $[M]^+ = 45055,0$  Da, beobachtete Masse  $[M]^+ = 45054,7$  Da). Außerdem erkennt man nicht reagiertes biotinyliertes Cys-tag Protein **2(BM)** (berechnete Masse  $[M]^+ = 50565,8$  Da, beobachtete Masse  $[M]^+ = 50566,1$  Da) und Int<sup>C</sup>-Produkt (**5**) (berechnete Masse  $[M]^+ = 48613,7$  Da, beobachtete Masse  $[M]^+ = 48613,1$  Da).

Sowohl im SDS-PAGE Gel, als auch im Western Blot konnte die Bildung einer neuen Bande nach 2h auf einer Höhe von ca. 45 kDa beobachtet werden, die mit der Abnahme der Eduktbanden einherging. Auch durch ESI-MS Analyse des Reaktionsansatzes konnte die Bildung des biotinylierten Spleißproduktes eindeutig nachgewiesen werden (berechnete Masse  $[M]^+ = 45055,0$  Da, beobachtete Masse  $[M]^+ = 45054,7$  Da). Anhand dieser Beispiele konnte gezeigt werden, dass verschiedene funktionelle Gruppen (Maleinimide und Iodacetamide), aber auch unterschiedliche biophysikalische Sonden (diverse Fluorophore und Affinitätsmarker wie Biotin) für die selektive Cysteinbiokonjugation des Cys-tag Proteins verwendet werden konnten. Im folgenden Abschnitt soll nun näher auf die zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten, wie die selektive Markierung von ungereinigten Proteinen in einem Zelllysats, sowie die selektive Modifikation von Cystein-haltigen Proteinen eingegangen werden.

#### 4.3.3 Selektive Modifikation von ungereinigten Proteinen in Zelllysaten

Die Assoziation der beiden komplementären Inteinfragmente DnaB<sup>N</sup> und DnaB<sup>C</sup> ist maßgeblich für die Selektivität der *trans*-Proteinspleißreaktion verantwortlich. Aus diesem Grund sind nur Proteine, die als Fusion mit komplementären Inteinfragmenten hergestellt

wurden, in der Lage miteinander zu reagieren. Diese Selektivität sollte zudem die Durchführung der Reaktion in einer komplexeren Umgebung, wie einem Zelllysats und mit ungereinigten Proteinen ermöglichen. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurde Fluorescein-markiertes Cys-tag Protein in einer Konzentration von 10  $\mu$ M zu lysierten *E. coli* Zellen gegeben, die das entsprechende komplementäre DnaB<sup>N</sup>-Konstrukt **1** (MBP-DnaB<sup>N</sup>-His<sub>6</sub>) produziert hatten. Die Reaktion wurde sofort bei Zugabe, sowie nach einer Stunde durch Zugabe von 4x SDS-PAGE Probenpuffer gestoppt und auf einem SDS-PAGE Gel analysiert (Abb. 29).



**Abbildung 29: Selektive Modifikation von Proteinen in einem *E. coli* Zelllysats.** Fluorescein-modifiziertes Cys-tag Protein wurde zu lysierten *E. coli* Zellen gegeben, die entweder das DnaB<sup>N</sup>-Fusionsprotein **1** produzierten (+) oder nicht produzierten (-). Nur in Gegenwart des Spleißpartners wurde modifiziertes Spleißprodukt **SP(IAF)** spezifisch und in guten Ausbeuten gebildet. Proteine mit einem His<sub>6</sub>-tag konnten anschließend noch durch analytische Ni<sup>2+</sup>-NTA-Chromatographie nachgewiesen und gereinigt werden (ger.).

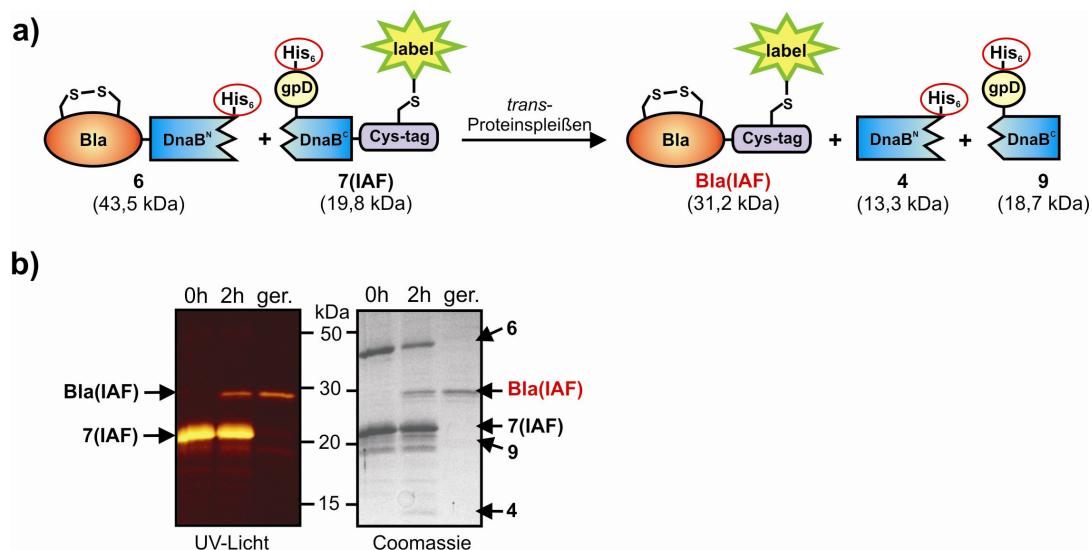
Es wurde nur so viel von dem *E. coli* Zelllysats zugegeben, dass sich in etwa gleiche Mengen des N-terminalen Inteinonstruktes und des C-terminalen Inteinfragmentes im Reaktionsansatz befand (siehe auch Abschnitt 3.3.3.5). Als Negativkontrolle diente ein Zelllysats der gleichen *E. coli* BL21 (DE3) Zellen, die allerdings das entsprechende N-terminale Inteinonstrukt nicht produzierten (ohne entsprechendes Expressionsplasmid). Im SDS-PAGE Gel ist zu erkennen, dass, nur wenn exprimiertes DnaB<sup>N</sup>-Fusionsprotein **1** im Zelllysats vorhanden war, Fluorescein-markiertes Spleißprodukt **SP(IAF)** spezifisch, in Gegenwart sehr großer Mengen verschiedener *E. coli* Proteine und in hohen Ausbeuten gebildet wurde. Ferner wurden keine unspezifischen Wechselwirkungen mit anderen *E. coli* Proteinen beobachtet. Weder reagierte das modifizierte Cys-tag Protein in Abwesenheit des Spleißpartners mit einem anderen Protein, noch wurde es während der Reaktion proteolytisch abgebaut.

Zusätzlich konnte das Spleißprodukt durch analytische  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA Affinitätschromatographie nachgewiesen und gereinigt werden, wobei die anderen His<sub>6</sub>-tag tragenden Proteine ebenfalls gereinigt wurden. Hiermit konnte sehr gut die Selektivität der Reaktion gezeigt werden, die aus diesem Grund hervorragend dazu geeignet ist, Proteine direkt im Zelllysate oder in anderen komplexen Gemischen zu modifizieren. Auch kann der Reinigungsschritt des N-terminalen Spleißpartners auf diese Weise umgangen werden.

### 4.3.4 Regioselektive Modifikation von Cystein-haltigen Proteinen

Ein besonders beachtenswerter Vorteil dieser Methode ist, dass auch Cystein-reiche Proteine mit einfachen Thiol-reaktiven Proben regioselektiv modifiziert werden können. Da in den Versuchen bisher immer das Cystein-freie Modellprotein MBP verwendet wurde, sollte im Folgenden die Anwendbarkeit des Ansatzes auf Proteine mit einem oder mehreren Cysteinen untersucht werden. Als Kandidaten kamen z.B. die Enzyme  $\beta$ -Laktamase (Bla) und Thioredoxin (Trx) in Frage, die beide über essentielle Cysteine in ihren jeweiligen Aminosäuresequenzen verfügen. Die  $\beta$ -Laktamase aus *E. coli* beispielsweise enthält zwei Cysteinreste, die eine Disulfidbrücke ausbilden und somit für die strukturelle Integrität des Enzyms mitverantwortlich sind [132]. Diese Disulfide würden unter den reduktiven Bedingungen der Biokonjugationsprozedur gespalten, woraufhin die freigelegten Cysteine unmittelbar mit den Thiol-reaktiven Substanzen reagieren könnten. Dadurch würde wahrscheinlich die Struktur und/oder die Aktivität des Enzyms beeinträchtigt werden. Durch diesen hier entwickelten Ansatz der regioselektiven Modifikation mittels *trans*-Proteinspleißen sollte dies umgangen werden und ein regioselektiv modifiziertes und aktives Enzym generiert werden. Zu diesem Zweck wurde als erstes ein Fusionsprotein aus der 30 kDa großen  $\beta$ -Laktamase und dem N-terminalen Inteinfragment hergestellt, was zu dem Konstrukt Bla-DnaB<sup>N</sup>-His<sub>6</sub> (6, 43,5 kDa) führte. Für eine vereinfachte Reinigung des Spleißproduktes wurde außerdem ein neues Cys-tag Protein 7 hergestellt (His<sub>6</sub>-gpD-DnaB<sup>C</sup>-Cys, 19,3 kDa), wobei das MBP durch das kleinere gpD-Kopfprotein des  $\lambda$ -Bakteriophagen ersetzt und der C-terminale His<sub>6</sub>-tag an den N-Terminus des Proteins versetzt wurde. Als Konsequenz war das Spleißprodukt **Bla(IAF)** das einzige Protein im Reaktionsgemisch ohne His<sub>6</sub>-tag und konnte somit im Durchfluss einer  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Affinitätschromatographiesäule angereichert werden. Außerdem enthielt das resultierende C-terminale Konstrukt nun die verkürzte aus sechs Aminosäuren bestehende Cys-tag Sequenz SIRSCG. Eine schematische Darstellung dieser Reaktion ist in Abb. 30 a) zu sehen. Da das N-terminale Fusionsprotein nach Zellaufschluss im unlöslichen Zellpellet gefunden wurde, musste es durch Zugabe von

Puffer mit 8 M Harnstoff gelöst und anschließend mittels  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen gereinigt werden (siehe auch 3.2.3.1 & 3.3.3.1). Anschließend konnte es durch Dialyse gegen Spleißpuffer bei 4°C zurückgefaltet werden. Das neue Cys-tag Protein **7** konnte dagegen aus der löslichen Fraktion eines *E. coli* Zelllysates gereinigt und anschließend mit 5-IAF modifiziert werden. Für die *trans*-Proteinspleißreaktion (Abb. 30 a) wurden nun beide Proteine im präparativen Maßstab in einer Konzentration von 8  $\mu\text{M}$  und einem Endvolumen von 1 mL miteinander gemischt. Dieser Reaktionsansatz wurde nun für zwei Stunden bei 25°C inkubiert. Eine spätere Auswertung der Spleißreaktion ergab, dass das Spleißprodukt **Bla(IAF)** zu etwa 30 % in Bezug auf das N-terminale Fusionsprotein gebildet wurde. Nach Ablauf der Reaktion wurde der gesamte Reaktionsansatz mit  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA Affinitätsmatrix gemischt und auf eine Chromatographiesäule geladen. Das gewünschte Spleißprodukt besaß keinen His<sub>6</sub>-tag und konnte deshalb im Durchfluss der Säule angereichert werden. Da das komplette Auftragen der Probe zusätzlich Puffer erforderte, war das Spleißprodukt im Durchfluss soweit verdünnt, dass ein Ankonzentrieren vonnöten war. Proben vor und nach der Reaktion, sowie eine Probe des gereinigten Spleißproduktes wurden mit 4x SDS-PAGE Probenpuffer gemischt und auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen. Das Gel wurde vor dem Anfärben mit Coomassie Brilliant Blau unter UV-Licht photographiert und ist in Abb. 30 b) dargestellt.



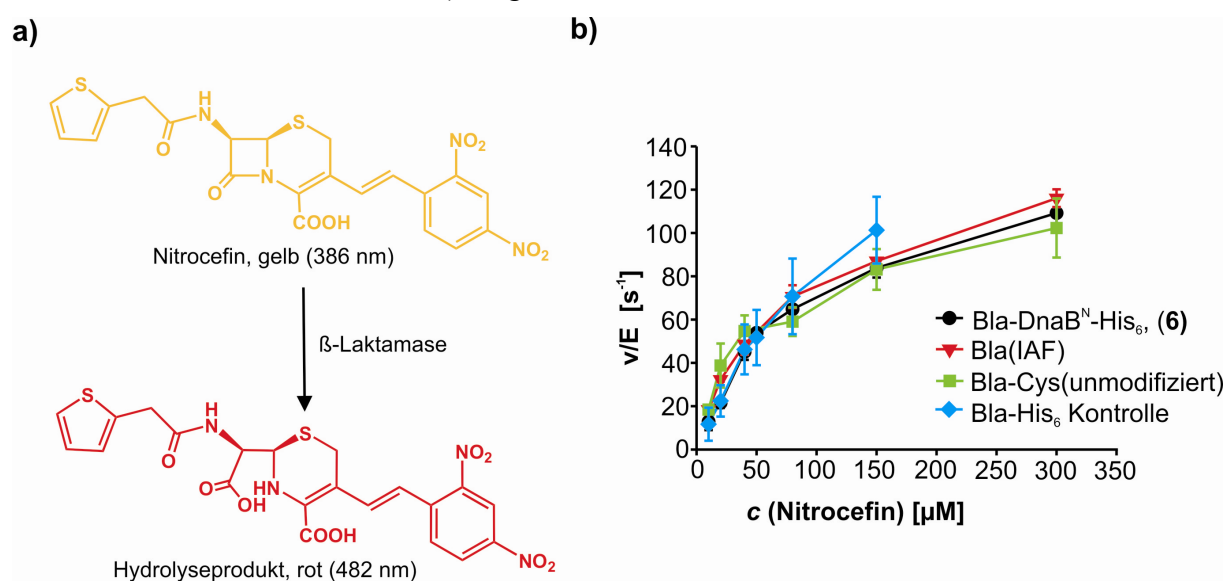
**Abbildung 30: Herstellung und Reinigung von Fluorescein-modifizierter  $\beta$ -Laktamase.** a) Die schematische Darstellung der Reaktion veranschaulicht die neuen Konstrukte und die Reinigungsstrategie, wobei alle Proteine außer dem Spleißprodukt einen His<sub>6</sub>-tag tragen. b) Das SDS-PAGE Gel der *trans*-Proteinspleißreaktion wurde vor dem Anfärben mit Coomassie Brilliant Blau (rechts) unter UV-Licht photographiert (links). In beiden Fällen ist die Bildung von Spleißprodukt **Bla(IAF)** nach 2h zu erkennen. Dieses wurde aus dem Reaktionsansatz im Durchlauf einer  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Chromatographie angereichert (ger.).

Nach erfolgreicher Reinigung der regioselektiv modifizierten  $\beta$ -Laktamase wurde die Enzymaktivität des gereinigten Proteins untersucht. Zu diesem Zweck wurde die  $\beta$ -



Laktamaseaktivität mittels Nitrocefin-Hydrolyse photometrisch bestimmt [128]. Nitrocefin ist ein chromogenes Cephalosporin, und gehört damit zur Klasse der  $\beta$ -Laktamantibiotika, dessen Absorptionsmaximum sich nach Spaltung des  $\beta$ -Laktamrings durch eine  $\beta$ -Laktamase von 386 nm (gelb) zu 482 nm (rot) verschiebt. Die Struktur und Hydrolyse von Nitrocefin ist in Abb. 31 a) gezeigt. Die enzymatische Aktivität wurde dabei durch photometrische Messungen bei einer Wellenlänge von 482 nm für verschiedene Konzentrationen an Nitrocefin (10-500  $\mu$ M) und einer Zeitspanne von jeweils 10 Minuten bestimmt. Zum Vergleich wurde auch die Aktivität von unmodifizierter  $\beta$ -Laktamase bestimmt (Bla-Cys), die ebenfalls durch *trans*-Proteinspleißen, allerdings mit dem unmodifizierten Cys-tag Protein (7), hergestellt wurde. Als weitere Kontrollen dienten ferner das Ausgangsfusionsprotein Bla-DnaB<sup>N</sup>-His<sub>6</sub> (6) und ein rekombinant hergestelltes Bla-His<sub>6</sub> Kontrollprotein.

Von allen Proben wurde die Nitrocefin-Hydrolyseaktivität bestimmt. Die Auftragungen der normierten Hydrolysegeschwindigkeiten gegen die Nitrocefinkonzentrationen sind in Abb. 31 b) dargestellt.



**Abbildung 31:  $\beta$ -Laktamase Aktivitätsassay.** a) Die  $\beta$ -Laktamase katalysiert die Spaltung des  $\beta$ -Laktamrings von Nitrocefin, wobei sich die Farbe von gelb zu rot ändert. Die Verschiebung des Absorptionsmaximums wurde dabei durch photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 482 nm bestimmt. b) Das Diagramm zeigt die Geschwindigkeiten der Nitrocefinhydrolyse der verschiedenen Proben aufgetragen gegen die Nitrocefinkonzentration. Die einzelnen Hydrolysegeschwindigkeiten wurden dabei jeweils durch die Enzymkonzentration geteilt und dadurch normiert. Dabei sind die Kurven für die modifizierte  $\beta$ -Laktamase (**Bla(IAF)**, rot) kaum von den Kontrollen mit unmodifizierter  $\beta$ -Laktamase (**Bla-Cys(unmodifiziert)**, grün), dem Fusionsprotein Bla-DnaB<sup>N</sup>-His<sub>6</sub> (6, schwarz) und rekombinant hergestellter  $\beta$ -Laktamase (Bla-His<sub>6</sub>, blau) zu unterscheiden.

Unter der Annahme das Michaelis-Menten-Bedingungen vorlagen, konnten außerdem die kinetischen Parameter, d.h. die  $K_M$ - und  $k_{cat}$ -Werte und daraus schließlich auch die katalytische Effizienz ( $k_{cat}/K_M$ ) bestimmt werden. Die  $k_{cat}/K_M$ -Werte waren dabei in allen Fällen sehr ähnlich und betrugen für das modifizierte Spleißprodukt (**Bla(IAF)**) 1,6 s<sup>-1</sup>  $\mu$ M<sup>-1</sup>,

2,3 s<sup>-1</sup>μM<sup>-1</sup> für das unmodifizierte Spleißprodukt (**Bla-Cys(unmodifiziert)**), 1,4 s<sup>-1</sup>μM<sup>-1</sup> für das Fusionsprotein **6** (Bla-DnaB<sup>N</sup>-His<sub>6</sub>) und 1,3 s<sup>-1</sup>μM<sup>-1</sup> für das rekombinant hergestellte Kontrollprotein Bla-His<sub>6</sub>. Alle kinetischen Parameter sind in der nachfolgenden Tabelle 6 zusammengefasst.

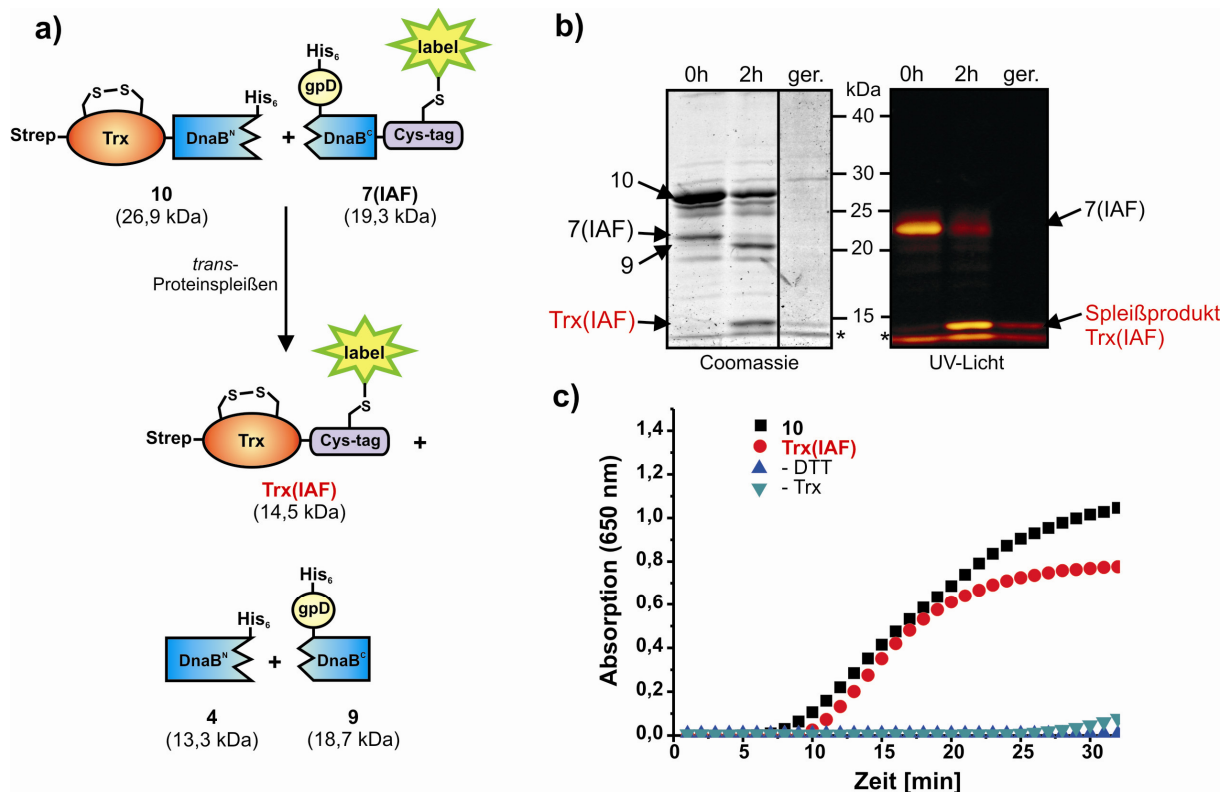
**Tabelle 6: Kinetische Parameter der β-Laktamase-Aktivität.**

Protein	K <sub>M</sub> [μM]	v <sub>max</sub> [x 10 <sup>-8</sup> s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> ]	k <sub>cat</sub> [s <sup>-1</sup> ]	k <sub>cat</sub> /K <sub>M</sub> [s <sup>-1</sup> μM <sup>-1</sup> ]
Bla-Cys(IAF)	99,4 ± 15	2,38 ± 0,13	158,6 ± 8,7	1,6 ± 0,2
Bla-Cys (unmodifiziert)	86,3 ± 12	3,17 ± 0,28	197,3 ± 26	2,3 ± 0,3
Bla-DnaB <sup>N</sup> -His <sub>6</sub>	90,6 ± 9,9	1,96 ± 0,09	126,8 ± 5,5	1,4 ± 0,1
Bla-His <sub>6</sub>	120 ± 14,3	5,08 ± 0,38	158,7 ± 12,2	1,3 ± 0,2

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Prozedur aus Reinigung, Modifikation durch *trans*-Proteinspleißen und erneuter Reinigung nur wenig Einfluss auf die Aktivität der β-Laktamase hatte. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die Kombination aus Cysteinbiokonjugation und *trans*-Proteinspleißen für die Herstellung modifizierter Proteine gut geeignet ist.

Als weiteres Beispiel für die regioselektive Modifikation Cystein-haltiger Proteine diene das 12 kDa große *E. coli* Protein Thioredoxin (Trx). Dieses kleine ubiquitäre Protein besitzt zwei redox-aktive Cysteinreste in einem exponierten aktiven Zentrum mit der Aminosäuresequenz –Cys-Gly-Pro-Cys- [133]. Es existiert entweder in der reduzierten Form Trx-(SH)<sub>2</sub> mit einem Dithiol oder in der oxidierten Form (Trx-S<sub>2</sub>), bei der beide Cysteinreste eine intramolekulare Disulfidbrücke ausbilden. Thioredoxin ist durch die reversible Oxidation des eigenen Dithiols zum Disulfid im aktiven Zentrum, vor allem an Redoxreaktionen beteiligt und katalysiert außerdem Dithiol-Disulfid-Austauschreaktionen. Trx-S<sub>2</sub> wird üblicherweise durch NADPH und die Flavoprotein-Thioredoxin-Reduktase reduziert. Die reduzierte Form Trx-(SH)<sub>2</sub> stellt eine leistungsfähige Proteindisulfidreduktase dar, die in zahlreichen Thiol-abhängigen, zellulären reduktiven Prozessen involviert ist [134]. Zur regioselektiven Modifikation wurde in diesem Fall zunächst das N-terminale Fusionsprotein Strep-Trx-DnaB<sup>N</sup>-His<sub>6</sub> (**10**, 26,9 kDa) hergestellt und in *E. coli* produziert. Auch in diesem Fall wurde das Protein denaturierend gereinigt und konnte hinterher durch Dialyse zurückgefaltet werden. Modifiziertes Trx konnte dann auf die gleiche Weise erhalten werden, wie vorher für die β-Laktamase beschrieben, d.h. es wurde mit dem modifizierten Cys-tag

Protein **7(IAF)** (His<sub>6</sub>-gpD-DnaB<sup>C</sup>-Cys(IAF)) im präparativen Maßstab für eine *trans*-Proteinspleißreaktion gemischt (Abb. 32 a) und das Spleißprodukt **Trx(IAF)** (19,7 kDa) konnte aus dem Durchfluss einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Chromatographie erhalten werden (Abb. 32 b). Dabei verlief die Spleißreaktion in diesem Fall mit einer Ausbeute von ca. 36 % bezogen auf das N-terminale Konstrukt. Auch hier war die Konzentration an Spleißprodukt im Durchfluss zunächst sehr gering (siehe gereinigte Bande (ger.) in Abb. 32b) und das Spleißprodukt musste ankonzentriert werden.



**Abbildung 32: Regioselektive Fluoresceinmodifikation von Thioredoxin und Aktivitätsassay.** a) Schematische Darstellung der *trans*-Proteinspleißreaktion zur Herstellung und Reinigung von modifiziertem Thioredoxin (**Trx(IAF)**). b) SDS-PAGE Gel der Spleißreaktion, das vor der Färbung mit Coomassie Brilliant Blau (links) unter UV-Licht photographiert wurde (rechts). Dabei ist jeweils deutlich die Abnahme des fluoreszierenden Cys-tag-Proteins **7(IAF)**, sowie das Entstehen der Spleißproduktbande von **Trx(IAF)** zu erkennen. Mit \* ist die Lauffront des Gels gekennzeichnet. Gereinigtes Spleißprodukt konnte anschließend im Durchfluss einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Chromatographiesäule gefunden werden (ger.). c) Nach Ankonzentrieren der Probe wurde die Trx-Aktivität durch photometrische Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 650 nm gemessen, wobei die Präzipitation der  $\beta$ -Kette von Insulin verfolgt wurde. Modifiziertes Trx war dabei nur etwas weniger aktiv als das Kontrollfusionsprotein Strep-Trx-DnaB<sup>N</sup>-His<sub>6</sub> (**10**). Als Negativkontrollen dienten Proben ohne DTT bzw. ohne Trx-Protein.

Die Thioredoxinaktivität wurde nach einer von Holmgren *et al.* entwickelten Methode bestimmt [129]. Dabei wird die Präzipitation der  $\beta$ -Kette des Insulins durch photometrische Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 650 nm verfolgt (vgl. Abschnitt 3.3.4.2). Dafür wurde die Reaktion durch Zugabe von DTT zu einem Reaktionsgemisch aus Insulin (0,1 % [v/v]), EDTA (2 mM) und Trx-Protein (10  $\mu$ M) in Puffer bei Raumtemperatur (22  $\pm$  1°C) in einem Endvolumen von 200  $\mu$ L gestartet. Eine Kontrollreaktion wurde unter gleichen

Bedingungen mit dem Ausgangsfusionsprotein **10** (Strep-Trx-DnaB<sup>N</sup>-His<sub>6</sub>) durchgeführt und als Negativkontrollen dienten Reaktionen, in denen entweder DTT oder Trx-Protein weggelassen wurden. Die Herstellung von Fluorescein-modifiziertem Trx zusammen mit dem anschließenden Aktivitätsnachweis ist in Abb. 32 gezeigt. Die etwas geringere Aktivität des modifizierten Thioredoxins kam vermutlich durch leichte Abweichungen in der Proteinkonzentration zustande. Nichtsdestotrotz zeigten diese beiden Beispiele, dass unterschiedliche Proteine, die als Fusion mit dem DnaB<sup>N</sup> Inteinfragment hergestellt und gereinigt wurden, durch *trans*-Proteinspleißen regioselektiv modifiziert werden konnten.

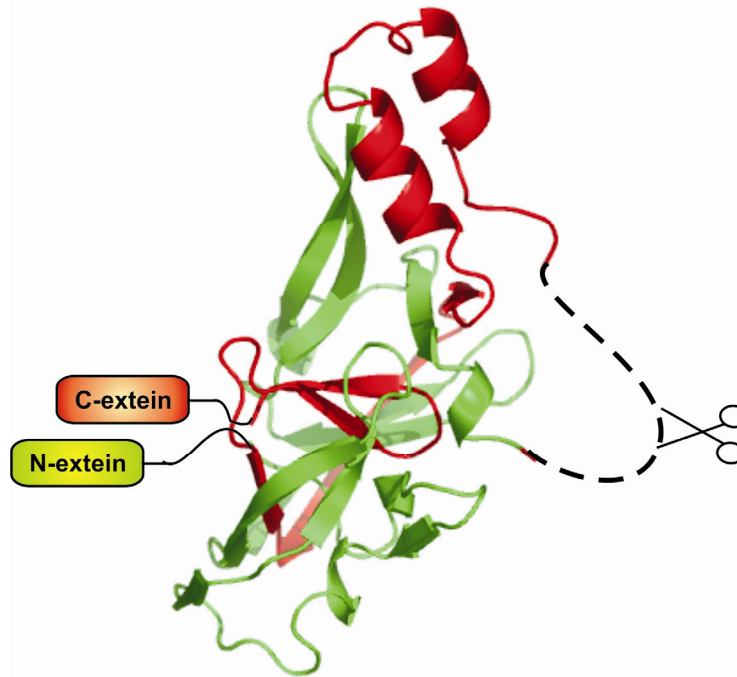
Eine Ausweitung dieses Ansatzes auf komplexere Proteine wie dem menschlichen Wachstumshormon (hGH), GFP oder Erythropoetin schlug allerdings aufgrund unzureichender Expressionsraten oder geringer Löslichkeit der N-terminalen Fusionsproteine fehl. Allein die nicht-ribosomale Peptidsynthetase TycA konnte als lösliches DnaB<sup>N</sup>-Fusionsprotein in *E. coli* produziert und anschließend gereinigt werden. Wurde dieses Protein anschließend in einer *trans*-Proteinspleißreaktion eingesetzt, waren die Spleißausbeuten jedoch sehr gering und betrugen maximal 5 %. Schon die Tatsache, dass eigentlich gut lösliche Proteine wie das Thioredoxin und die  $\beta$ -Laktamase als Fusion mit dem DnaB<sup>N</sup>-Inteinfragment unlöslich waren, zeigte, dass das verwendete gesplattene DnaB Intein nicht ausreichend tolerant gegenüber den verwendeten N-Exteinen in Bezug auf Löslichkeit und Spleißaktivität war. Aus diesem Grund wurde nach Möglichkeiten gesucht, ein robusteres, generell anwendbares System zu generieren, das auch mit komplexen Proteinen hohe Spleißausbeuten liefert und auch für die Cys-tag Modifikation von Proteinen anwendbar sein sollte. Darauf soll in den folgenden Kapiteln eingegangen werden.

#### **4.4 Herstellung und Charakterisierung des neuen gespaltenen *Mxe* GyrA Inteins**

Das Hauptproblem des zuvor verwendeten DnaB Inteins war wie beschrieben die schlechte Löslichkeit, insbesondere der Fusionsproteine des N-terminalen DnaB Inteinfragmentes. Dies kann unter anderem daran liegen, dass hydrophobe Reste, die zuvor im Inneren des Proteins verborgen waren, durch das künstliche Spalten des Proteins und das zusätzliche Entfernen der Endonukleasedomäne freigelegt wurden. Inteine zeichnen sich zwar generell dadurch aus, dass sie recht tolerant in Bezug auf die Exteinsequenzen sind, aber wenn zusätzlich die natürliche Umgebung auf der Seite der Endonukleasedomäne verändert wird, kann dies zu schlechteren Expressionsraten und/oder schlechterer Löslichkeit der Inteinfusionen führen. Um diese Tendenzen so gering wie möglich zu halten, wurde nach alternativen Inteinen gesucht, mit denen diese Probleme so weit wie möglich umgangen werden könnten. Vielversprechend erschien in diesem Zusammenhang die Verwendung eines Mini-Inteins, bei dem natürlicherweise die Endonukleasedomäne fehlt. So besitzt beispielsweise das Intein der Untereinheit A der Gyrase aus *Mycobacterium xenopi*, im Gegensatz zu allen anderen GyrA Inteinen, anstelle der Endonukleasedomäne eine 18 Aminosäuren lange flexible Schlaufenregion [94]. In der Literatur war zudem bereits beschrieben, dass das *Mxe* GyrA Intein in dieser Region geschnitten und eine heterologe Endonukleasedomäne integriert werden konnte, wobei sowohl Intein als auch Endonuklease ihre Aktivität beibehielten [135]. Außerdem wird dieses Intein vielfach in einem kommerziellen Vektor zur Herstellung von Thioestern und zur tag-freien Reinigung von Proteinen genutzt [136, 137], wodurch es ausreichend tolerant gegenüber zahlreichen N-Exteinen sein sollte. Eine weitere vorteilhafte Eigenschaft ergab sich potentiell durch die Möglichkeit, unlösliche Inteinfusionsproteine zurückzufalten, was ebenfalls schon anhand verschiedener Beispiele gezeigt wurde [138, 139]. Ein weiteres wichtiges Kriterium war die Verwendung des Inteins für die Cys-tag Modifikation von Proteinen. Zu diesem Zweck durfte der erste nukleophile Rest des C-Exteins kein Cystein sein. Dies ist für das GyrA Intein der Fall, da hier die Hydroxygruppe eines Threonins an Position +1 an der Umesterungsreaktion im Verlauf der Spleißreaktion beteiligt ist. Durch Spaltung des Mini-Inteins an jener Position in der flexiblen Schlaufenregion, an der wie zuvor beschrieben schon eine heterologe Endonukleasedomäne erfolgreich eingesetzt wurde, konnte zudem ein gespaltenes Intein mit Cystein-freier C-terminaler Hälfte generiert werden.

Zur Herstellung der beiden Inteinfragmente wurde das *Mxe* GyrA Intein auf DNA-Ebene zwischen den Aminosäuren R119 und G120, die in dieser flexiblen Region liegen,

gespalten. Dadurch wurde ein 119 Aminosäure langes N-terminales Inteinfragment ( $\text{GyrA}^{\text{N}}$ ) und ein 79 aa umfassendes C-terminales Inteinfragment ( $\text{GyrA}^{\text{C}}$ ) erhalten. Die beiden generierten Inteinfragmente sind in der Kristallstruktur in Abb. 33 farblich dargestellt. Zusätzlich ist der flexible Bereich mit der Spaltstelle schematisch angedeutet. Des Weiteren sind auch die Positionen der beiden Exteine gezeigt.

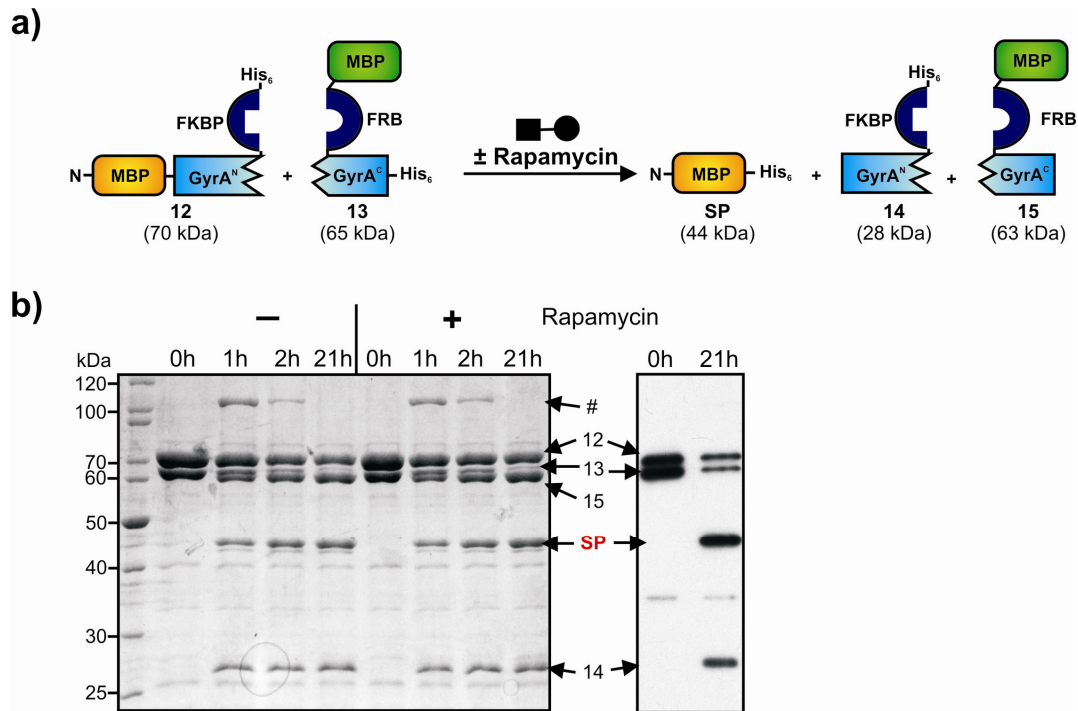


**Abbildung 33: Kristallstruktur des *Mxe* GyrA Inteins und Position der Spaltstelle.** Die Position der N- und C-Exteine ist ebenso dargestellt, wie die flexible Region inklusive der Spaltstelle. Die flexible Schlaufenregion war in den Strukturdaten (PDB-code: 1AM2) nicht enthalten und wurde schematisch ergänzt. Das resultierende N-terminale Inteinfragment ist in grün und das entsprechende C-terminale Inteinfragment in rot dargestellt.

Durch die Erzeugung von anderen künstlich gespaltenen Inteinen war in der Literatur bekannt, dass insbesondere die ersten flankierenden Aminosäuren auf beiden Seiten des Inteins relativ intolerant gegenüber Veränderungen sind und deshalb wenn möglich beibehalten werden sollten [83]. Aus diesem Grund wurden die ersten zwei N-terminalen Exteinamino­säuren (RY, Position -1 und -2) und die ersten drei C-terminalen Exteinamino­säuren (TEA, Position +1 bis +3) beibehalten. Ein Austausch von  $\text{DnaB}^{\text{N}}$  und  $\text{DnaB}^{\text{C}}$  aus Abb. 20 durch diese beiden GyrA Inteinfragmente führte zu den beiden Konstrukten  $\text{MBP-GyrA}^{\text{N}}\text{-FKBP-His}_6$  (**12**) und  $\text{MBP-FRB-GyrA}^{\text{C}}\text{-His}_6$  (**13**), mit MBP als N-Extein und einem  $\text{His}_6$ -tag als C-Extein (siehe Abb. 34 a). Zusätzlich war noch das Heterodimerisierungssystem bestehend aus FKBP und FRB für die Rapamycin induzierte Inteinfragmentassoziation enthalten, da nicht bekannt war, ob die beiden Intein­hälften eine natürliche Affinität zueinander besitzen würden. Die zusätzlichen Fusionen von  $\text{Int}^{\text{C}}$  mit MBP

und von Int<sup>N</sup> mit His<sub>6</sub> dienten der vereinfachten Proteinreinigung und zum Verfolgen der Spleißreaktion mittels SDS-PAGE und Western Blot.

Als erstes wurde die *trans*-Proteinspleißreaktion der beiden Konstrukte mit und ohne Rapamycin untersucht (Abb. 34 a). Diese Reaktion verlief mit einer Ausbeute von ca. 50 % unabhängig davon, ob Rapamycin zugegeben wurde oder nicht. Die Bildung von Spleißprodukt **SP** (MBP-His<sub>6</sub>, 44,8 kDa) wurde ferner durch einen Anti-His Western Blot nachgewiesen. Dabei konnten alle His<sub>6</sub>-tag tragenden Ausgangskonstrukte und Produkte gefunden werden. Das einzige keinen His<sub>6</sub>-tag tragende Protein **15** (MBP-FRB-GyrA<sup>C</sup>, 63,4 kDa) ist nicht auf dem Western Blot erkennbar. Dies ist in Abb. 34 b) dargestellt. Auf dem SDS-PAGE Gel ist außerdem zu sehen, dass das GyrA<sup>N</sup>-Konstrukt in einem leichten Überschuss eingesetzt wurde. Aus diesem Grund wurde das komplementäre GyrA<sup>C</sup>-Protein während des Reaktionsverlaufs fast vollständig verbraucht. Ferner ist auffällig, dass zu Beginn der Reaktion eine Bande bei knapp über 100 kDa entsteht (im SDS-PAGE Gel in Abb. 34 b) mit # beschriftet), die im weiteren Verlauf der Reaktion allerdings wieder abnimmt und am Endpunkt der Reaktion nicht mehr vorhanden ist. Anhand der Größe und des relativ kurzlebigen Charakters wurde vermutet, dass es sich dabei um eine Zwischenstufe der Spleißreaktion, nämlich um das verzweigte Intermediat handeln könnte. Dieses hat eine berechnete Größe von 108 kDa und besteht aus dem GyrA<sup>C</sup>-Konstrukt, an das zusätzlich das N-Extein über eine Thioesterbindung gebunden ist. Ein weiteres Indiz für diese Behauptung ist die Tatsache, dass die Intensität der Bande für das zeitgleich mit dem verzweigten Intermediat gebildete Produkt GyrA<sup>N</sup>-FKBP-His<sub>6</sub> (**14**), im Reaktionsverlauf kaum weiter zunimmt. Erstaunlich ist in diesem Zusammenhang allerdings die Stabilität dieses Zwischenproduktes, da es weder durch denaturierenden SDS-PAGE Probenpuffer, noch durch Erhitzen auf 95°C zerstört wurde. Auf die genaue Natur und eine weitere Charakterisierung dieser Zwischenstufe soll in den folgenden Abschnitten noch genauer eingegangen werden.



**Abbildung 34: Spleißaktivität des gespaltenen *Mxe* GyrA Inteins.** Ein Austausch von DnaB<sup>N</sup> und DnaB<sup>C</sup> durch die GyrA Inteinfragmente ergab die in a) gezeigten Konstrukte. Dabei war MBP das N-Extein und ein His<sub>6</sub>-tag diente als C-Extein. Zusätzlich waren die Heterodimerisierungsdomänen FKBP und FRB vorhanden. b) Das Coomassie Brilliant Blau gefärbte SDS-PAGE Gel der Reaktion (links) zeigt zum Einen, dass die Bildung von Spleißprodukt (SP) zeitabhängig und zum Anderen unabhängig davon verlief, ob Rapamycin vorhanden (+) oder nicht vorhanden war (-). Die Abnahme der beiden Edukte, sowie die Zunahme der beiden His<sub>6</sub>-tag tragenden Produkte konnte ferner durch einen Anti-His Western Blot detektiert werden (rechts). Die Bande knapp über 100 kDa des vermuteten verzweigten Intermediats (berechnete Größe 108 kDa) ist mit # markiert.

Desweiteren ist zwar im SDS-PAGE Gel, jedoch nicht im Western Blot in Abb. 34 b) unterhalb des Spleißproduktes eine schwache Bande zu erkennen, die wahrscheinlich durch Hydrolyse eines (Thio-)esterintermediates zustande kam und das N-Extein MBP darstellt.

Ferner ist zu erkennen, dass die Reaktion anders als beim DnaB Intein nach 2 Stunden noch nicht beendet war, da die Intensität der Spleißproduktbande im weiteren Verlauf noch zunahm und auch noch die Bande des Zwischenproduktes (#) noch zu erkennen war. In einer zeitabhängigen Untersuchung dieser Spleißreaktion konnte gezeigt werden, dass nach 4h kein Intermediat mehr detektiert werden konnte und die Intensität der Spleißproduktbande auch nicht weiter zunahm. Demnach waren 4h ausreichend, um die Reaktion vollständig ablaufen zu lassen. Wurden die Proteine in einem Verhältnis von 1:1 eingesetzt, konnten dabei Ausbeuten von 55 % Spleißprodukt erzielt werden. Eine konzentrationsabhängige Messung ergab im Bereich von 2 bis 8  $\mu$ M keine nennenswerten Unterschiede an Spleißausbeuten. Wurde das N-terminale Intein konstrukt in einem noch deutlich größeren Überschuss (5fach, bzw. 10fach) eingesetzt, als in Abb. 34 gezeigt, so führte dies nicht zu größeren Spleißproduktausbeuten, sondern stattdessen nahm die Menge an Hydrolyseprodukt zu (Daten



nicht gezeigt). Ein Überschuss des GyrA<sup>C</sup>-Konstruktes führte ebenfalls zu ca. 50 % Spleißproduktbildung, wobei das GyrA<sup>N</sup>-Konstrukt nicht vollständig verbraucht wurde.

Dadurch, dass die Spleißreaktion unabhängig von der Zugabe an Rapamycin war, konnte analog zum DnaB Intein auch für das *Mxe* GyrA Intein gezeigt werden, dass die beiden generierten Inteinhälften auch nach Spaltung und getrennter Produktion und Reinigung noch eine natürliche Affinität zueinander aufwiesen. Aus diesem Grund sollten auch hier die beiden Heterodimerisierungsdomänen FKBP und FRB auf DNA-Ebene entfernt werden. Für eine Anwendung zur Cys-tag Modifikation von Proteinen war insbesondere das Entfernen der Cystein-haltigen FRB-Domäne des GyrA<sup>C</sup>-Konstruktes entscheidend. Hierbei stellte sich jedoch heraus, dass zwar die FRB-Domäne ohne Aktivitätsverlust entfernt werden konnte, das Entfernen der FKBP-Domäne von den N-terminalen Konstrukten führte allerdings zum Verlust jeglicher Spleißaktivität. Wie bereits für das DnaB Intein beschrieben, könnte auch hier die strukturelle Veränderung der Inteinfragmente zum Verlust der Tertiärstruktur führen. Während dies im Falle des DnaB Inteins allerdings in den meisten Fällen zu schlechten Expressionsraten und/oder schlechter Löslichkeit der Int<sup>N</sup>-Fusionsproteine führte, zeigten die GyrA<sup>N</sup>-Fusionsproteine zwar weiterhin eine gute Löslichkeit, aber stattdessen den Verlust jeglicher Spleißaktivität. Nur durch Verwendung einer stabilisierenden Domäne wie der FKBP-Domäne konnte die Spleißaktivität aufrechterhalten werden. Aus diesem Grund wurden in weiteren Experimenten GyrA<sup>N</sup>-Fusionsproteine mit C-terminaler FKBP-Domäne und GyrA<sup>C</sup>-Fusionsproteine ohne FRB-Domäne verwendet.

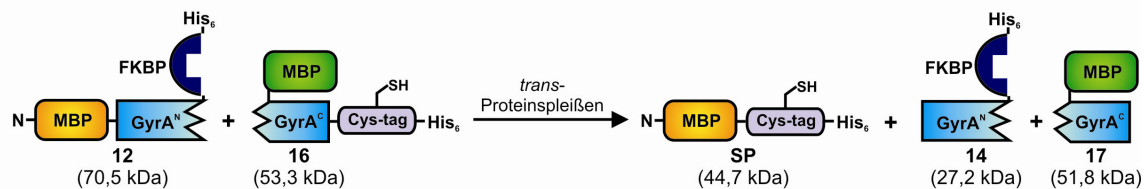
Die Aktivität des GyrA<sup>C</sup>-Fusionsproteins ohne die Cystein-haltige FRB-Domäne in *trans*-Proteinspleißreaktionen ermöglichte außerdem die Verwendung des gespaltenen GyrA Inteins für die vorher beschriebene Cys-tag Modifikation von Proteinen. Zu diesem Zweck wurde ein einzelnes Cystein in die Exteinsequenz des GyrA<sup>C</sup>-Konstruktes durch Punktmutations-PCR eingeführt (3.1.1). Dadurch wurde der Cys-tag TEAGSCS-His<sub>6</sub> erhalten. Wie für das DnaB Intein beschrieben, wurde auch hier zunächst die Zugänglichkeit des Cysteinrestes für Modifikationsreagenzien, sowie die Spleißaktivität von modifizierten und unmodifizierten GyrA<sup>C</sup>-Cys-tag Konstrukten untersucht.

### 4.4.1 Einfluss des Cys-tags auf die Spleißaktivität des GyrA Inteins

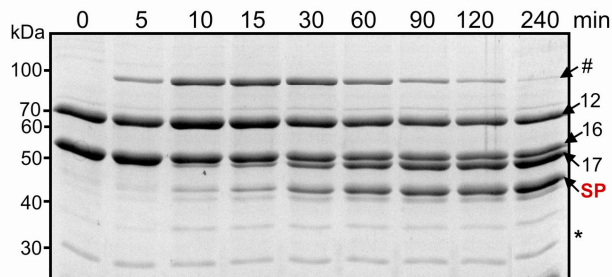
Zuerst wurde untersucht, inwieweit sich die Veränderung der C-Exteinsequenz durch Einführung des Cysteins auf die Spleißaktivität auswirkte. Für diese Untersuchung wurde das entsprechende neue Cys-tag Konstrukt **16** (MBP-GyrA<sup>C</sup>-Cys-His<sub>6</sub>, 53,3 kDa) in einer Spleißreaktion mit dem komplementären GyrA<sup>N</sup>-Konstrukt **12** (MBP-GyrA<sup>N</sup>-FKBP-His<sub>6</sub>,

70,5 kDa) in einer Konzentration von 4  $\mu$ M gemischt und der Reaktionsverlauf bei 25°C durch Probennahme und Analyse auf einem SDS-PAGE Gel verfolgt. Dieses Gel der zeitabhängigen Reaktion ist in Abb. 35 b) dargestellt und zeigt die Abnahme der beiden Ausgangsproteine, sowie die Zunahme der Spleißproduktbande (SP) und der Bande des Produktes MBP-GyrA<sup>C</sup> (17). Dabei ist auch hier die starke Bildung einer Bande, in diesem Fall bei knapp unter 100 kDa auffällig. Diese entsteht schon in den ersten Minuten der Reaktion, wonach die Intensität zwischen 15 und 30 Minuten ein Maximum durchläuft und anschließend wieder deutlich abnimmt. Zur genaueren Analyse wurde von den Proben bei 0h, 30 min und 4h ein Anti-His Western Blot durchgeführt (Abb. 35 c). Auch hierin ist bei der 30 min Probe eine Bande bei knapp 100 kDa erkennbar. Dies deutet ebenfalls auf das verzweigte Intermediat hin, das in diesem Fall eine berechnete Größe von 96,6 kDa hat (der Größenunterschied kommt durch das Fehlen der FRB-Domäne zustande) und einen His<sub>6</sub>-tag trägt. Außerdem ist hier die Bande des GyrA<sup>N</sup>-Inteinfragments **14** (GyrA<sup>N</sup>-FKBP-His<sub>6</sub>, 27,2 kDa) die im SDS-PAGE Gel in Abb. 35 b), wegen der zu geringen Größe nicht erkennbar ist, sowohl im SDS-PAGE Gel als auch im Western Blot klar zu erkennen (Abb. 35 c). Auch eine leichte Bildung des Hydrolyseproduktes MBP unterhalb der Spleißproduktbande ist erkennbar.

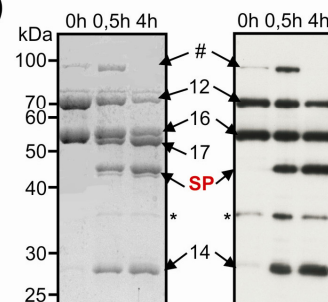
a)



b)

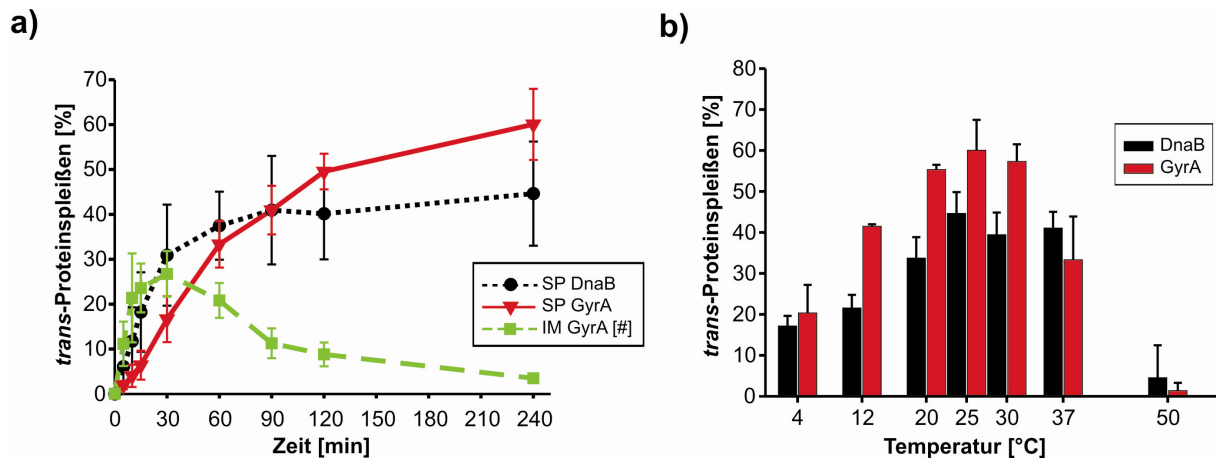


c)



**Abbildung 35.: Einfluss des zusätzlichen Cysteins in der C-Exteinsequenz des GyrA<sup>C</sup>-Konstruktes auf die Spleißaktivität.** a) Schematische Darstellung der *trans*-Proteinspleißreaktion. b) SDS-PAGE Gel des zeitlichen Verlaufs der Reaktion. Die Abnahme der Eduktbanden, sowie die Zunahme der Spleißproduktbande (SP) ist deutlich zu erkennen. c) Die Spleißproduktbildung ist sowohl im Coomassie gefärbten SDS-PAGE Gel (links), als auch im Anti-His Western Blot (rechts) zu erkennen. In beiden Fällen konnte auch deutlich eine Bande bei knapp 100 kDa detektiert werden. Diese stellt die verzweigte Zwischenstufe der Spleißreaktion dar und ist mit # markiert. (Verunreinigungen sind mit \* markiert.)

Auch in diesem Fall wurden die Bandenintensitäten densitometrisch analysiert. Da die Akkumulation des postulierten verzweigten Intermediates (#) einen ganz erheblichen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit und Spleißproduktausbeute ausübte, wurde auch die Intensität dieser Bande densitometrisch ausgewertet. Dabei konnte eine Ausbeute an Spleißprodukt von gut 60 % nach 4h und eine maximale Intermediatmenge von knapp 30 % nach 30 min ermittelt werden. Die graphische Auftragung der Spleißproduktbildung (SP GyrA, rote Kurve), ist zusammen mit der Zu- und Abnahme des verzweigten Intermediates (IM GyrA [#], grün) in Abb. 36 a) dargestellt. Zum Vergleich ist ebenfalls die Spleißaktivität des zuvor beschriebenen DnaB Inteins dargestellt (SP DnaB, schwarze Kurve). Zusätzlich wurde auch für das neu gesplattene GyrA Intein die Temperaturabhängigkeit bestimmt. Ein Vergleich mit dem DnaB Intein ist in Abb. 36 b) zu sehen.



**Abbildung 36: Densitometrische Auswertung des zeitlichen Verlaufs, sowie Temperaturabhängigkeit der Spleißreaktion des GyrA Inteins und Vergleich mit dem DnaB Intein.** a) In der graphischen Darstellung ist die Kurve der Spleißproduktbildung des *Mxe* GyrA Inteins (SP GyrA, rot) im Vergleich zum DnaB Intein (SP DnaB, schwarz) dargestellt. Außerdem ist die prozentuale Bildung des postulierten verzweigten Intermediates dargestellt (IM GyrA, grün). b) Das Profil der temperaturabhängigen Spleißreaktion nach 4h der beiden Inteine ist sehr ähnlich, wobei durch das *Mxe* GyrA Intein (rot) in der Regel höhere Spleißausbeuten erzielt werden konnten.

Ein Vergleich der Reaktion des GyrA Inteins mit dem DnaB Intein zeigt, dass die Spleißproduktbildung des DnaB Inteins zunächst deutlich schneller ablief, aber auch eher (nach ca. 1h) eine Sättigung erreichte. Im Gegensatz dazu war die Spleißproduktbildung beim GyrA Intein deutlich verlangsamt, kam aber nach 4h auf insgesamt höhere Spleißausbeuten. Dagegen war beim GyrA Intein zuerst die Bildung des Zwischenproduktes (IM, #) maßgeblich, dessen Kurve sogar steiler anstieg als die Kurve für die Spleißproduktbildung des DnaB Inteins. Auch das Diagramm der Temperaturabhängigkeit zeigt, dass das GyrA Intein im Allgemeinen die höheren Spleißausbeuten nach 4h lieferte. Beide Inteine zeigten zwar ein Maximum der Spleißproduktbildung bei 25 °C, dabei erreichte das DnaB Intein

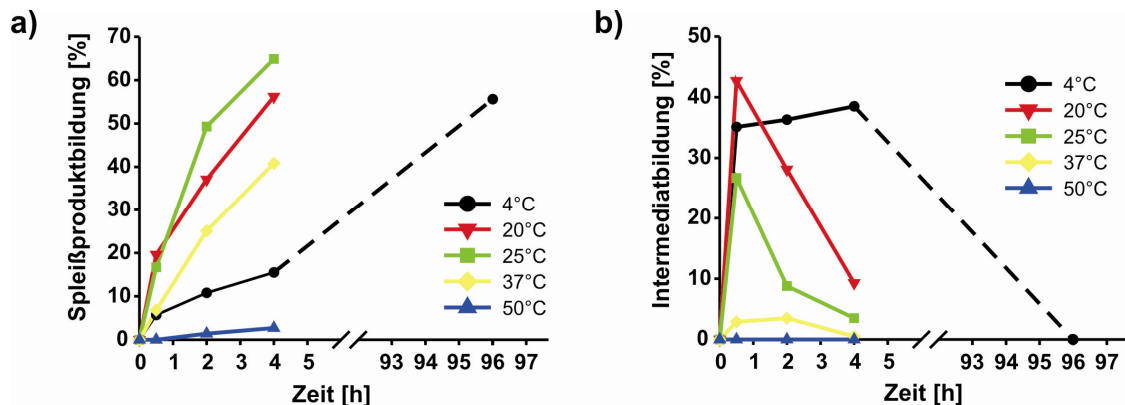
lediglich eine Spleißausbeute von ca. 45 %, während das GyrA Intein auf gut 60 % Spleißproduktbildung kam. Bei 12°C war der Unterschied der Spleißproduktausbeute zwischen den beiden Inteinen am Größten, wobei die Werte für das GyrA Intein fast doppelt so hoch waren, wie für das DnaB Intein (41 % vs. 21 %). Auch bei ca. 4°C konnte noch Spleißaktivität beobachtet werden. Die Spleißproduktausbeute betrug nach 4h für das GyrA Intein zwar nur knapp 20 %, aber stattdessen trat zunächst eine verstärkte Akkumulation des verzweigten Intermediates auf (siehe auch Abb. 37 b). Nach 30 min wurde beispielsweise ca. 35 % Intermediat gebildet, während noch so gut wie kein Spleißprodukt beobachtet werden konnte. Nach 4h war immer noch knapp 40 % Intermediat vorhanden, aber es wurde auch schon knapp 20 % Spleißprodukt gebildet. Ganz erstaunlich ist in diesem Zusammenhang, dass die Reaktion bei 4°C und ausreichend langer Inkubationszeit auch den Endpunkt von ca. 60 % Spleißprodukt erreichen konnte. So zeigt sich, dass nach 4 Tagen kein Intermediat mehr vorhanden war, aber zu 56 % Spleißprodukt gebildet wurde (siehe Abb. 37 a). Diese Ergebnisse sind zum größten Teil in Abb. 37 und zusammen mit allen anderen ermittelten Ausbeuten für Spleißprodukt (SP) und Intermediat (IM) bei den verschiedenen Temperaturen in Tabelle 7 zusammengefasst.

**Tabelle 7: Prozentuale Bildung von Spleißprodukt (SP) und Intermediat (IM) des GyrA Inteins bei verschiedenen Temperaturen und zu bestimmten Zeitpunkten. (n.d. = nicht bestimmt)**

Temp. [°C]	SP 30 min [%]	IM 30 min [%]	SP 2h [%]	IM 2h [%]	SP 4h [%]	IM 4h [%]	SP 4d [%]	IM 4d [%]
4	5,7	35,1	10,8	36,3	15,5	38,5	55,6	0
12	n.d.	n.d.	28,3	33,3	41,5	6,3	n.d.	n.d.
20	19,6	42,7	37,1	28,1	56,2	9,3	n.d.	n.d.
25	16,7	26,7	49,3	8,8	64,9	3,5	n.d.	n.d.
30	n.d.	n.d.	46,0	13,5	63,3	2,0	n.d.	n.d.
37	6,8	2,9	25,1	3,5	40,8	0,5	n.d.	n.d.
50	0	0	1,4	0	2,7	0	n.d.	n.d.

Vergleicht man diese Werte untereinander, erkennt man, dass die Bildung des Intermediates eine stabile und langlebige Zwischenstufe der Spleißreaktion darstellt und diese auch essentiell für die Bildung des Spleißproduktes ist. Bei tiefen Temperaturen akkumuliert es zu einem hohen Prozentsatz und Spleißprodukt wird nur sehr verlangsamt gebildet, während bei Temperaturen zwischen 20 und 37 °C zunächst ebenfalls verstärkt Intermediat

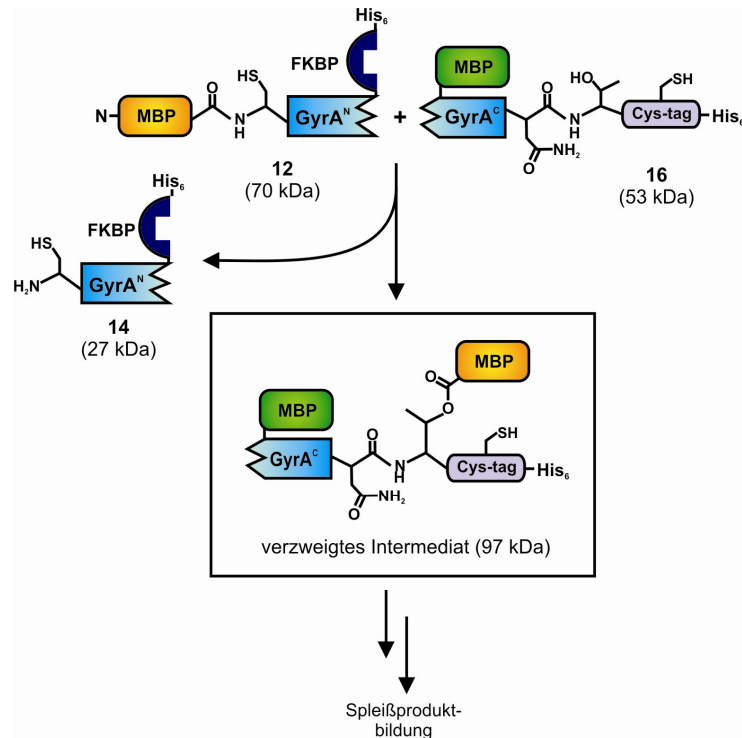
gebildet wird, dieses aber recht zügig zum Spleißprodukt weiterreagiert. Nach 4h ist dabei jeweils kaum noch Intermediat nachweisbar, während das Spleißprodukt mit hohen Ausbeuten von 40-65 % gebildet wurde. Bei Temperaturen von 50°C kann kein Intermediat mehr gebildet werden, wodurch auch die Spleißproduktbildung verhindert wird. Interessant ist außerdem, dass die Spleißproduktbildung in den ersten 30 Minuten, nicht bei 25°C, sondern bei 20°C am schnellsten ist (19,6 % vs. 16,7 %). Die Spleißprodukt- und Intermediatbildung für verschiedene Temperaturen ist graphisch zusammengefasst in Abb. 37 dargestellt.



**Abbildung 37: Temperaturabhängigkeit der Spleißprodukt- und Intermediatbildung des GyrA Inteins.** a) Die Spleißproduktbildung erreicht bei einer Temperatur von 25°C die größten Ausbeuten. Bei geringeren Temperaturen dauert das Erreichen der maximalen Spleißausbeute entsprechend länger. Auch bei 4°C und einer Reaktionszeit von 4 Tagen konnte eine Ausbeute von knapp 60 % Spleißprodukt erreicht werden. Bei 50°C wird dagegen fast gar kein Spleißprodukt gebildet. b) Die Bildung des Intermediates sinkt mit steigenden Temperaturen, so dass bei 37°C und 50°C fast kein Intermediat mehr beobachtet wurde. Geringere Temperaturen führen dagegen zu einer Akkumulation des Intermediats, wobei die Weiterreaktion entsprechend länger dauert. Nach 4 Tagen ist beispielsweise auch bei 4°C kein Intermediat mehr vorhanden.

Zur weiteren Charakterisierung des Zwischenproduktes, das zwar für alle Inteine als Zwischenstufe der Spleißreaktion postuliert wurde, aber nur im Falle des *Psp* GB-D Pol Inteins auch tatsächlich nachgewiesen werden konnte [79, 82], wurde eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Dafür wurde die mit (#) beschriftete Bande aus Abb. 35 ausgeschnitten und mit Trypsin proteolytisch verdaut (3.4.2). Die eluierten tryptischen Peptidfragmente wurden schließlich per MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert (3.4.4). Dabei war es zwar nicht möglich, einen direkten Beweis für die Existenz dieser Intermediatspezies zu erbringen, da alle gefundenen Peptidfragmente, auch in den Ausgangsproteinen enthalten waren. Jedoch konnte durch Vergleich der Peptidfragmente des postulierten Intermediates mit den ebenso behandelten und analysierten Ausgangsproteinen ein starkes indirektes Indiz für die Existenz und Zusammensetzung dieser stabilen Zwischenstufe erhalten werden. Dabei war entscheidend, dass das verzweigte Intermediat aus dem C-terminalen Konstrukt **16** besteht, woran das N-Extein als Ester gebunden ist. Das Int<sup>N</sup>-Fragment **14** (GyrA<sup>N</sup>-FKBP-His<sub>6</sub>) war in der Bande des Intermediates (#) nicht vorhanden.

Eine schematische Darstellung des Intermediates ist in Abb. 38 (zur Formation des verzweigten Intermediates siehe auch den detaillierten Spleißmechanismus in Abb. 14). zu sehen und der Vergleich der detektierten Massen der Peptidfragmente ist im Anhang in Tabelle 10 zusammengefasst.



**Abbildung 38: Bildung und Darstellung des verzweigten Intermediates und der massenspektrometrisch untersuchten Proteine.** Die Bildung des verzweigten Intermediates erfolgt durch eine N-S-Acylumlagerung und anschließender Umesterung. Dabei wird die kovalente Bindung zwischen Int<sup>N</sup> und dem N-Extein gebrochen. Die beiden Inteinfragmente sind zu diesem Zeitpunkt noch assoziiert, wobei diese nicht-kovalente Bindung durch SDS-PAGE zerstört wird. Das verzweigte Intermediat besteht demnach aus dem Int<sup>C</sup>-Konstrukt, woran das N-Extein über eine Esterbindung gebunden ist. In einer massenspektrometrischen Analyse der proteolytisch verdauten Bande des verzweigten Intermediates sollten also alle Peptidfragmente bis auf die von Protein 14 (GyrA<sup>N</sup>-FKBP-His<sub>6</sub>) gefunden werden.

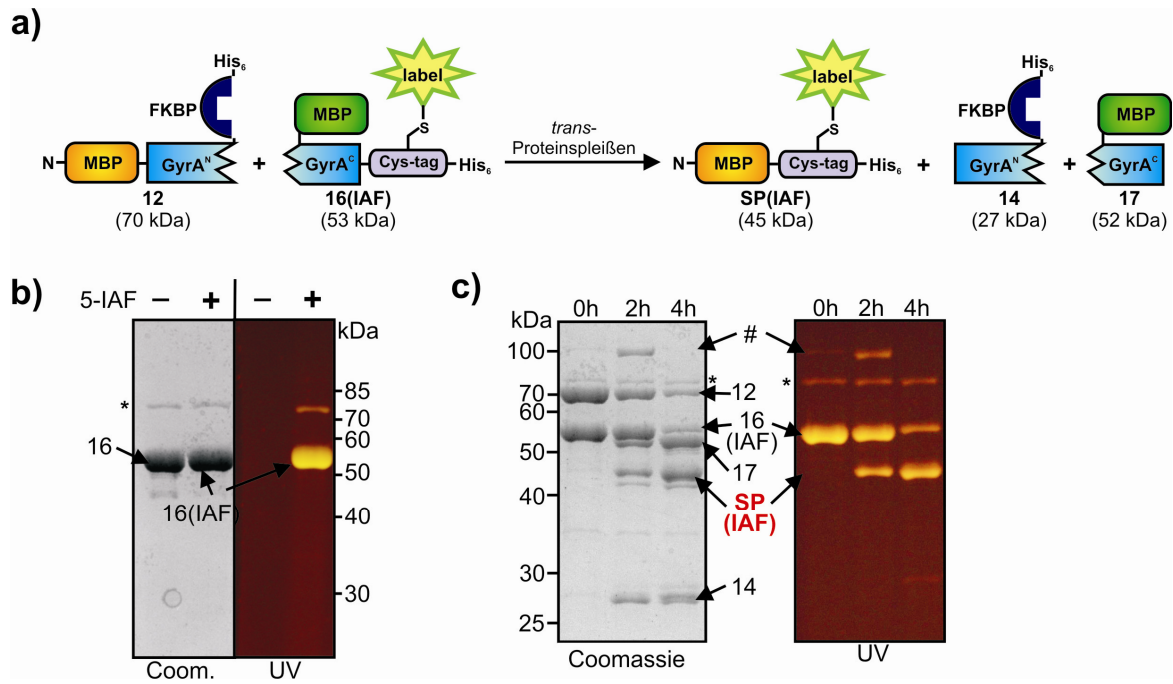
Das verzweigte Intermediat ist eine Zwischenstufe der Proteinspleißreaktion und entsteht durch den nukleophilen Angriff des (in diesem Falle) Threonins auf den Thioester der zwischen N-Extein und Int<sup>N</sup> ausgebildet wird. Durch diese Umesterungsreaktion ist das N-Extein dann über eine Esterbindung an das Int<sup>C</sup>-Konstrukt gebunden. Das Int<sup>N</sup>-Fragment (hier: GyrA<sup>N</sup>-FKBP-His<sub>6</sub>) bleibt dabei noch mit dem Int<sup>C</sup>-Fragment assoziiert, jedoch wird dieser nicht-kovalente Komplex durch die Zugabe von SDS-PAGE Probenpuffer zerstört, wodurch auf einem SDS-PAGE Gel nur die beiden kovalent gebundenen Teile, das verzweigte Intermediat und das Int<sup>N</sup>-Fragment zu erkennen sind. Die MALDI-TOF Analyse der tryptischen Peptidfragmente aus der mit # beschrifteten Bande ergab genau dieses beschriebene Muster: es konnten Peptide aus allen Teilen des Int<sup>C</sup>-Proteins 16, sowie des N-Exteins identifiziert werden, allerdings wurden keine Peptidfragmente des Proteins GyrA<sup>N</sup>-

FKBP-His<sub>6</sub> (**14**) gefunden. Allerdings ist zu bemerken, dass die eigentliche Spleißstelle zwischen Int<sup>C</sup> und C-Extein mit dem Ester-gebundenen N-Extein nicht identifiziert werden konnte. Dies könnte allerdings darauf zurückzuführen sein, dass die Esterbindung bei der Probenvorbereitung zur massenspektrometrischen Analyse gebrochen wurde.

### 4.4.2 Fluorophor-Modifikation und Spleißreaktion des GyrA<sup>C</sup>-Cys-tag Proteins

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der eingefügte Cysteinrest in der Exteinsequenz des GyrA<sup>C</sup>-Konstruktes keinen merklichen Einfluss auf die Spleißaktivität ausübte, sollte die Zugänglichkeit des neu eingeführten Cysteinrestes für verschiedene Modifikationsreagenzien überprüft werden. Dazu wurde zunächst die Modifikation mit Fluorophoren, z.B. mit Iodacetamido-Fluorescein untersucht. Zur Reduktion von intermolekularen Disulfidbrücken wurde das Cys-tag Protein zunächst in Gegenwart eines 5fachen molaren Überschusses an DTT inkubiert, wonach ein 25facher Überschuss an Modifikationsreagenz zugegeben wurde. Nach Inkubation für ca. 2h bei RT wurde die Reaktion mit einem 100fachen molaren Überschuss an DTT gestoppt und nach Zugabe von 4x SDS-PAGE Probenpuffer und Erhitzen auf 95°C auf einem SDS-PAGE Gel analysiert (Abb. 39 b). Der Erfolg der Modifikationsreaktion konnte dabei anhand des Auftretens einer fluoreszierenden Bande im SDS-PAGE Gel unter UV-Licht verfolgt werden. Kleine Verunreinigungen, z.B. andere *E. coli* Proteine wurden dabei ebenfalls modifiziert (mit \* markiert). Anschließend wurde das modifizierte Protein auf seine Spleißaktivität hin untersucht. Dazu wurde das modifizierte Cys-tag Konstrukt **16(IAF)** (MBP-GyrA<sup>C</sup>-Cys(IAF)-His<sub>6</sub>, 53,3 kDa) mit dem komplementären N-terminalen Protein **12** (MBP-GyrA<sup>N</sup>-FKBP-His<sub>6</sub>, 70,5 kDa) in einer Konzentration von 4 µM in Spleißpuffer gemischt und bei 25°C inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben genommen, und auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen. Zur Analyse wurde dieses Gel zunächst unter UV-Licht photographiert, bevor es mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt wurde (Abb. 39 c).





**Abbildung 39: Modifikation des GyrA-Cys-tag-Konstruktes und Spleißreaktion des modifizierten Proteins.** a) Schematische Darstellung der *trans*-Proteinspleißreaktion. b) GyrA<sup>C</sup>-Cys-tag-Protein 16 vor (-) und nach (+) Modifikation mit 5-Iodacetamido-Fluorescein (5-IAF). c) Spleißreaktion des modifizierten Cys-tag Proteins mit dem komplementären GyrA<sup>N</sup>-Fusionsprotein 12. Es ist deutlich die Bildung des fluoreszierenden Spleißproduktes **SP(IAF)** zu erkennen. Ebenso ist bei der 2h Probe die Bildung einer fluoreszierenden Bande bei knapp 100 kDa erkennbar, was ebenfalls auf das verzweigte Intermediat hindeutet (#). In beiden Fällen wurde das SDS-PAGE Gel vor der Coomassie-Färbung unter UV-Licht photographiert (\* = Verunreinigungen).

Im SDS-PAGE Gel der Spleißreaktion ist die Abnahme der Bandenintensitäten, sowohl von N- als auch C-terminalem Ausgangskonstrukt im Reaktionsverlauf deutlich zu erkennen, während eine Bande in Höhe von ca. 45 kDa, also auf der Höhe des zu erwartenden Spleißproduktes entsteht und mit der Zeit stark zunimmt. Eine densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten ergab einen Reaktionsverlauf, der sich kaum von der Reaktion von unmodifiziertem Protein (vgl. Abb. 35 c) und Abb. 39 c) unterschied. Hierbei konnte sogar noch eine etwas größere Spleißausbeute von knapp über 70 % erzielt werden. Der Reaktionsverlauf kann in diesem Fall besonders gut unter UV-Licht, anhand der Abnahme der fluoreszierenden Eduktbande und Zunahme der ebenfalls fluoreszierenden Spleißproduktbande **SP(IAF)** im SDS-PAGE Gel verfolgt werden. Desweiteren ist auch hier eine Fluorophor-tragende Bande bei knapp 100 kDa sichtbar, was ebenfalls auf die Identität des verzweigten Intermediates hindeutet. Auch wurde eine geringe Menge (< 10 %) an Hydrolyseprodukt gebildet (schwache Bande im SDS-PAGE Gel unterhalb der Spleißproduktbande). Dieses Beispiel zeigt demnach sehr deutlich, dass das Cystein des Cys-tags nach Reduktion mit DTT durchaus für eine Modifikation zugänglich war. Außerdem wurde gezeigt, dass die Modifikation mit Fluorophoren die Spleißreaktion des GyrA Inteins in keiner Weise beeinträchtigte.

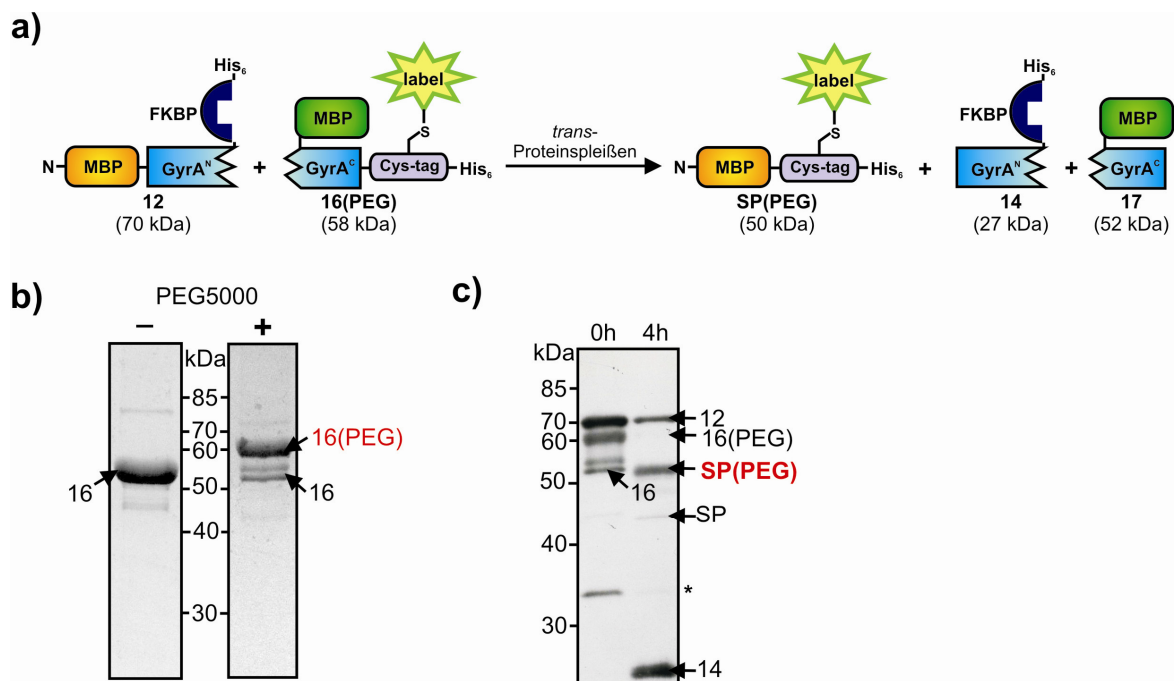


#### 4.4.3 PEGylierung des GyrA<sup>C</sup>-Cys-tag-Proteins

Nachdem die Modifikation mit Fluorophoren erfolgreich verlief und der modifizierte Cys-tag ohne Verlust an Spleißaktivität auf das N-Extein übertragen werden konnte, sollte in einem weiteren Beispiel gezeigt werden, dass auch andere Modifikationsreagenzien für diesen Ansatz verwendet werden können. Eine pharmazeutisch und medizinisch wichtige Modifikation ist das Anbringen von Polymereinheiten, insbesondere von Polyethylenglykoleinheiten (PEG). Diese sind je nach Kettenlänge flüssig oder fest, zudem chemisch inert, wasserlöslich und nicht-toxisch. Wegen ihrer guten Wasserlöslichkeit und variablen Konsistenz werden sie u. a. als Wirkstoffträger in der Medizin (z.B. in Salben, Tabletten, etc.), in Kosmetika aber auch für viele andere technische Anwendungen benutzt. PEGylierte Wirkstoffe zeichnen sich dabei besonders durch eine erhöhte Bioverfügbarkeit und verbesserten Schutz gegen Proteasen aus [140].

Diese Polymereinheiten werden oft auch über Cysteinbiokonjugation an diverse pharmazeutisch relevante Proteine gehängt. Dabei spielt allerdings die Chemo- und Regioselektivität eine entscheidende Rolle, weil medizinische oder pharmazeutische Produkte möglichst homogen sein müssen. Außerdem stellt die Größe der Modifikation mit Molekülmassen von bis zu mehreren 10.000 Da eine gewaltige Veränderung dar, die je nach Position sehr wohl die Struktur und/oder Aktivität des Zielproteins beeinflussen kann. Aus diesen genannten Gründen stellt die Cys-tag Modifikation eine ideale Methode dar, Proteine regioselektiv und homogen mit PEGylierungsreagenzien zu modifizieren. Zu diesem Zweck wurde das reduzierte Cys-tag Protein mit einem 25fachen Überschuss an PEG-5000-Maleinimid (siehe Abb. 24) bei Raumtemperatur für ca. 2h inkubiert und die Reaktion anschließend mit überschüssigem DTT gestoppt und mittels SDS-PAGE ausgewertet. Auf dem SDS-PAGE Gel dieser Modifikation (Abb. 40 a) erkennt man deutlich, dass die Bande nach der Reaktion zu größeren Molekularmassen verschoben ist. Während die Proteinbande vor Modifikation etwas über 50 kDa auf dem SDS-PAGE Gel läuft, befindet sie sich nach Modifikation auf einer Höhe von knapp über 60 kDa. Die kleine Diskrepanz zur berechneten Masse von 58 kDa kann dadurch zustande kommen, dass die PEG-Kette zwar die Größe des Proteins verändert, aber nicht dessen Ladung, da sie selbst keine Ladung trägt. Aus diesem Grund laufen PEGylierte Proteine in der Regel langsamer in einem SDS-PAGE Gel als nicht-PEGylierte Proteine von vergleichbarer molekularer Masse [141, 142]. Auch eine Quantifizierung der Modifikationseffizienz durch densitometrische Analyse der Bandenintensitäten ist nicht möglich, weil durch die PEG-Einheit die Bindungsstärke von Färbungsmitteln wie Coomassie Brilliant Blau herabgesetzt wird. Es ist jedoch zu erkennen,

dass die Reaktion nicht vollständig ablief, da auf dem SDS-PAGE Gel noch kleine Mengen des nicht-PEGylierten Cys-tag Protein zu erkennen sind (Abb. 40 b). Außerdem ist eine weitere Bande zwischen unmodifiziertem und modifiziertem Protein zu erkennen. Die genaue Identität dieser Bande konnte nicht geklärt werden, allerdings ist es möglich, dass es sich dabei um PEGyliertes Produkt mit geringerer Molekularmasse handelt, die durch Verunreinigung des Reagenzes entstand. Das modifizierte Protein wurde anschließend auf Spleißaktivität untersucht. Dazu wurde der N-terminale Spleißpartner in gleicher Konzentration zugegeben (jeweils 4  $\mu$ M) und die Reaktion bei 25°C für 4h inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch einen Anti-His-Western Blot analysiert (Abb. 40 c), wodurch nur His<sub>6</sub>-tragende Proteine (alle bis auf MBP-GyrA<sup>C</sup>, 17) angefärbt wurden.



**Abbildung 40: PEGylierung des Cys-tag Proteins & Spleißreaktion.** a) Schematische Darstellung der Reaktion. b) SDS-PAGE Gel des Cys-tag-Proteins **16** vor (-) und nach (+) Modifikation mit Polyethylenglykol-5000-Maleinimid (PEG5000). Durch die Modifikation wurde die Proteinbande zu größeren Molekularmassen verschoben. c) Western Blot der *trans*-Proteinspleißreaktion von PEGyliertem GyrA<sup>C</sup>-Protein. Man erkennt, dass nach 4h die Int<sup>N</sup>-Eduktbande zum großen Teil und die PEGylierte Int<sup>C</sup>-Bande vollständig verbraucht wurden, während zwei neue Banden, darunter das PEGylierte Spleißprodukt **SP(PEG)** gebildet wurden. Die Bildung von kleinen Mengen an unPEGyliertem Spleißprodukt (**SP**) geht auf Reste von unmodifiziertem Cys-tag Protein (**16**) im Reaktionsansatz zurück (\* = Verunreinigungen).

Im Western Blot erkennt man, dass die Bandenintensitäten von sowohl GyrA<sup>N</sup>-, als auch des PEGylierten GyrA<sup>C</sup>-Konstrukts im Reaktionsverlauf merklich abnehmen und zwei neue Banden entstehen. Zum Einen bildete sich eine Bande unterhalb von 30 kDa, die auf das Int<sup>N</sup>-Fragment (GyrA<sup>N</sup>-FKBP-His<sub>6</sub>, **14**) zurückgeführt werden konnte und zum Anderen eine weitere Bande bei ca. 50 kDa, die aufgrund der Größe dem PEGylierten Spleißprodukt **SP(PEG)** zugeschrieben werden konnte. Eine schwache Bande bei ca. 45 kDa war auf

unPEGyliertes Spleißprodukt (**SP**) zurückzuführen, welches vermutlich durch die Reaktion mit dem noch im Reaktionsansatz vorhandenen unmodifizierten Cys-tag Protein gebildet wurde. Die Banden von PEGylierten Proteinen erschienen dabei zumeist etwas verschwommener, was auf die weiter oben beschriebene reduzierte Anfärbung oder auf eine Inhomogenität des PEGylierungs-Reagenzes zurückzuführen ist.

Mit diesem Beispiel konnte gezeigt werden, dass selbst große Gruppen wie eine Polyethylenglykoleinheit mit der molekularen Masse von 5.000 Da erfolgreich an das Cystein des Cys-tag Proteins gebunden werden konnten. Außerdem war es möglich, den PEGylierten Cys-tag durch *trans*-Proteinspleißen mit einem N-Exteinprotein kovalent zu verknüpfen. Dieser Ansatz stellt damit einen erfolgsversprechenden Weg zur regioselektiven Modifikation von Proteinen mit hochmolekularen Polymereinheiten dar, was durch herkömmliche Cysteinmodifikationsreaktionen nur selten erreicht werden kann.

#### **4.4.4 Modifikation von Cystein-reichen Proteinen**

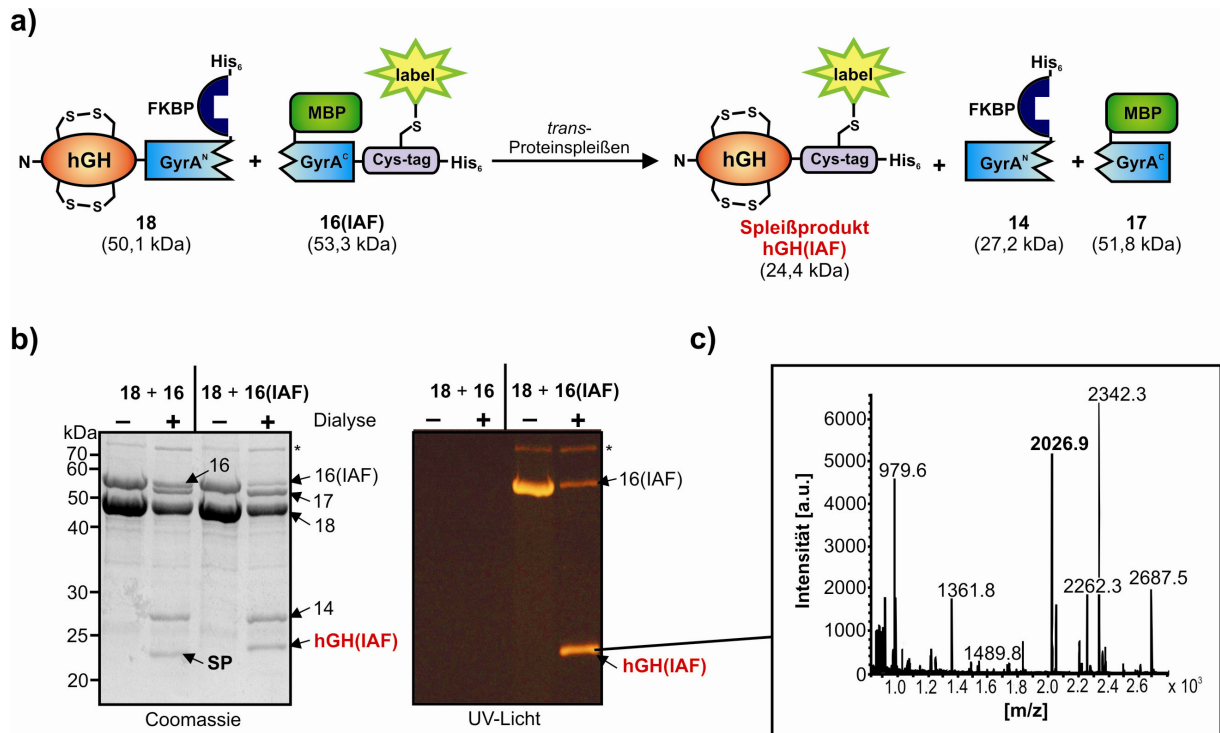
Als nächstes sollte die Anwendbarkeit des neuen gespaltenen GyrA Inteins für die regioselektive Modifikation von Cystein-reichen Proteinen untersucht werden. Dafür wurden zum Einen ein Protein-Therapeutikum, das menschliche Wachstumshormon hGH (engl. human growth hormone) und zum Anderen ein großer Multi-Domänen Enzymkomplex, die nicht-ribosomale Peptidsynthetase TycA ausgewählt.

Beide stellen interessante und komplexe Beispiele dar, bei denen eine herkömmliche Cysteinbiokonjugation aufgrund der Protein-eigenen Cysteine nicht anwendbar ist. Auch die regioselektive Cys-tag Modifikation mithilfe des DnaB Inteins misslang aufgrund der schlechten Expressionsrate des hGH-DnaB<sup>N</sup>-Fusionproteins und der geringen Spleißausbeute des TycA-DnaB<sup>N</sup>-Fusionsproteins mit dem Cys-tag Protein. Deswegen wurden diese Proteinmodifikationen nun in Kombination mit dem gespaltenen GyrA Intein durchgeführt.

##### **4.4.4.1 Modifikation des menschlichen Wachstumshormons (hGH)**

Das aus 190 Aminosäuren bestehende menschliche Wachstumshormon hGH besitzt vier Cysteine in der Primärsequenz, die zwei Disulfidbrückenbindungen zwischen den Aminosäuren Cys53 & Cys165, sowie zwischen Cys182 & Cys189 ausbilden. Dadurch entstehen zwei Schlaufen, die dem Protein seine Struktur verleihen [143]. Herkömmliche Cysteinbiokonjugation würde hierbei zu einer Reduktion der Disulfidbrücken führen, was die Struktur und damit sehr wahrscheinlich auch die Aktivität des Proteins zerstören würde. Dies

machte es zu einem ausgezeichneten Beispiel für die Cys-tag Modifikation. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von hGH wird es zumeist unter denaturierenden Bedingungen aus Einschlusskörpern (engl. inclusion bodies) gereinigt. Deshalb war es auch nicht verwunderlich, dass das N-terminale Fusionsprotein **18** (hGH-GyrA<sup>N</sup>-FKBP-His<sub>6</sub>, 50,1 kDa) in der unlöslichen Fraktion nach Produktion in *E. coli* und Zellaufschluss gefunden wurde. Es wurde daher zunächst in denaturierendem Puffer mit 8 M Harnstoff gelöst und anschließend ebenfalls denaturierend über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographiesäule gereinigt. Die direkte Dialyse des gereinigten Fusionsproteins gegen Spleißpuffer ohne Harnstoff schlug fehl, da das gesamte Protein ausfiel. Darum wurde ein anderer Weg gewählt. Hierfür wurde das GyrA<sup>C</sup>-Cys-tag Protein mit dem denaturierten Int<sup>N</sup>-Fusionsprotein **18** und 2 mM DTT gemischt und der gesamte Reaktionsansatz in einen Dialyseschlauch überführt. Die Konzentration an Harnstoff betrug im Endeffekt aufgrund der Verdünnung durch das Int<sup>C</sup>-Konstrukt und DTT ca. 6 M. Es wurde nun bei 4°C über Nacht und anschließend noch zweimal für eine halbe Stunde jeweils gegen frischen Spleißpuffer ohne Harnstoff dialysiert. Anschließend wurde noch einmal für 30 min bei Raumtemperatur dialysiert. Das Reaktionsgemisch wurde aus dem Dialyseschlauch genommen und danach noch mal für 2h bei 25°C inkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von 4x SDS-PAGE Probenpuffer gestoppt und auf einem SDS-PAGE Gel analysiert wurde. Dabei wurde sowohl unmodifiziertes (**16**), als auch Fluorescein-modifiziertes GyrA<sup>C</sup>-Cys-tag Protein **16(IAF)** eingesetzt. Als Vergleich wurde jeweils eine Probe vor Beginn der Dialyse mit aufgetragen. Diese Reaktion ist in Abb. 41 dargestellt. Hierbei war zu erkennen, dass Spleißprodukt, unabhängig davon, ob modifiziertes oder unmodifiziertes GyrA<sup>C</sup>-Protein eingesetzt wurde, mit guten Ausbeuten gebildet wurde. Es wurde jedoch festgestellt, dass die Konzentrationen der beiden Spleißpartner nicht gleich waren; die Konzentration des N-terminalen Fusionsprotein war in etwa doppelt so hoch wie die des Cys-tag Proteins (Abb. 41 b), wodurch auch der modifizierte C-Terminus im Reaktionsverlauf fast vollständig verbraucht wurde. Die leicht unterschiedlichen Konzentrationen kamen dabei vermutlich durch Fehler in der Berechnung zustande, da vor und während der Dialyse kein Ausfallen der Proteine beobachtet wurde.



**Abbildung 41: Herstellung von regioselektiv Fluorescein-modifiziertem hGH.** a) Schematische Darstellung der *trans*-Proteinspleißreaktion. b) SDS-PAGE Gel der Spleißreaktion des denaturierten hGH-Int<sup>N</sup>-Fusionsproteins **18** mit modifiziertem und unmodifiziertem Cys-tag-Protein (**16(IAF)** bzw. **16**). Dabei ist jeweils die Reaktion vor (-) und nach (+) Dialyse gezeigt. Das Gel wurde vor der Färbung mit Coomassie Brilliant Blau (links) unter UV-Licht photographiert (rechts). c) Die Bande des fluoreszierenden Spleißprodukts **SP(IAF)** wurde ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und die Peptidfragmente anschließend durch MALDI-TOF-MS analysiert. Dabei ist besonders die Masse der Peptidsequenz, die die Spleißstelle enthält und die Fluoresceinmodifikation trägt, hervorgehoben (YTEGSC(IAF)SHHHHHH, beobachtete Masse [M+H]<sup>+</sup> = 2026,9 Da; berechnete Masse [M+H]<sup>+</sup> = 2027,02 Da).

Eine exakte quantitative Bestimmung der Menge an Spleißprodukt war aufgrund des Verdünnungseffekts während der Dialyse nicht möglich. Allerdings ist zu bemerken, dass dieser Effekt nicht ganz unerheblich war, da die Bandenintensitäten nach der Dialyse in allen Fällen etwas geringer waren. Es ist jedoch ebenfalls zu erwähnen, dass sich die Bandenintensitäten nach der Dialyse auf mehrere Edukte und Produkte verteilen und außerdem die Intensität der Banden in einem SDS-PAGE Gel mit geringerer Molekularmasse der Proteine proportional abnimmt.

Zum Beweis, dass tatsächlich modifiziertes hGH gebildet wurde, wurde die fluoreszierende Bande aus Abb. 41 b) ausgeschnitten und das darin enthaltene Protein mit Trypsin proteolytisch verdaut. Die eluierten Peptidfragmente wurden anschließend massenspektrometrisch untersucht. Das Massenspektrum der erhaltenen Peptidfragmente ist in Abb. 41 c) dargestellt und eine Zuordnung der Peptidfragmente zu einzelnen Peptidsequenzen findet sich in Tabelle 8. Hierbei ist das Fragment hervorgehoben, welches die Spleißstelle enthält und zudem Fluorescein-modifiziert ist (YTEAGSC(IAF)SHHHHHH, beobachtete Masse [M+H]<sup>+</sup> = 2026,89 Da; berechnete Masse [M+H]<sup>+</sup> = 2027,02 Da).

Dabei sind sowohl Werte gezeigt, die bestimmten Peptidfragmenten zugeordnet werden konnten, als auch nicht gefundene Fragmente bis zu einer Größe von minimal 1.000 Da. Auftretende Modifikationen (IAF = Fluorescein-modifiziert und PAM = Acrylamidaddukt) wurden mitberücksichtigt. Auffallend war dabei insbesondere, dass kein unmodifiziertes Peptidfragment der Spleißstelle (YTEAGSCSHHHHHH) gefunden werden konnte. Eine Untersuchung des unmodifizierten Spleißproduktes aus Abb. 41 b) (linke Seite) zeigte dies jedoch als Acrylamidaddukt (beobachtete Masse  $[M+H]^+ = 1710,7$  Da; berechnete Masse  $[M+H]^+ = 1710,69$  Da).

**Tabelle 8: Zuordnung der ermittelten Massen zu den jeweiligen Peptidfragmenten des modifizierten Spleißproduktes hGH(IAF) aus Abb. 41 b) (PAM = Acrylamidaddukt).**

Berechnete Masse [Da]	Beobachtete Masse [Da]	Peptidsequenz	Position
2687,28	2687,5	YSFLQNPQTS LC(PAM)FSESIPTPSNR	hGH <sub>44-66</sub>
2342,13	2342,3	LHQLAFD TYQEFEEAYIPK	hGH <sub>22-40</sub>
2262,13	2262,3	SVFANSLVYGASDSNVYDLLK	hGH <sub>97-117</sub>
2055,20	2055,2	ISLLLIQSWLEPVQFLR	hGH <sub>80-96</sub>
2027,02	2026,9	YTEAGSC(IAF)SHHHHHH	Spleißstelle inkl. modifiziertem Cys-tag
1639,66	n.d.	YTEAGSCSHHHHHH	Spleißstelle unmodifiziert
1489,69	1489,8	FDTNSHNDDALLK	hGH <sub>148-160</sub>
1361,67	1361,8	DLEEGIQ TLMGR	hGH <sub>118-129</sub>
1288,56	n.d.	SVEGSC(PAM)GFEFR	hGH <sub>186-196</sub>
1219,59	n.d.	NYGLLYC(PAM)FR	hGH <sub>161-169</sub>
1118,60	n.d.	MGFPTIPLSR	hGH <sub>1-10</sub>
979,50	979,6	LFDNAML R	hGH <sub>11-18</sub>

Durch Kombination der Cys-tag Technik mit einem neuen Rückfaltungsprotokoll konnte auch das unlösliche, Cystein-reiche menschliche Wachstumshormon hGH regioselektiv modifiziert werden, ohne dass dabei Cysteine im hGH selbst beeinflusst wurden.

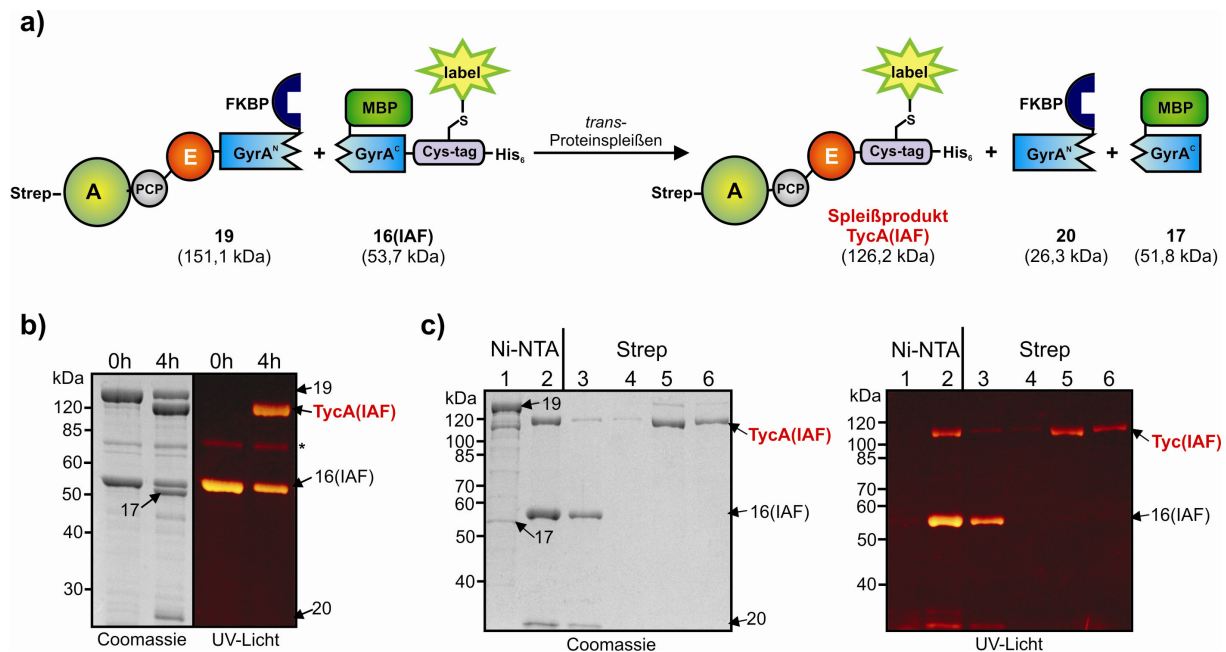
#### 4.4.4.2 Modifikation einer nicht-ribosomalen Peptidsynthetase

Als zweites Beispiel sollte eine große Multi-Domänen-Peptidsynthetase regioselektiv modifiziert werden. Zur Klasse der nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) gehören Enzyme, die unterschiedliche Sekundärmetabolite produzieren und normalerweise in Mikroorganismen vorkommen. Die Produkte der NRPS zeichnen sich durch eine enorme strukturelle Variabilität und unterschiedliche biologische Aktivität aus [144-146]. Die erzeugten Peptide weisen oftmals eine zyklische und/oder verzweigte Struktur auf und können auch nicht-proteinogene Aminosäuren wie D-Aminosäuren, N-methylierte und N-formylierte Aminosäuren tragen, oder auch glykosiliert, acyliert, halogeniert und hydroxyliert sein [147]. Zu den natürlichen Produkten der NRPS zählen Toxine und Siderophore, genauso wie Peptidantibiotika, Cytostatika und Immunsuppressiva. Prominente Beispiele sind u.a. Cyclosporin, Vancomycin, Daptomycin, Surfactin, Enterobactin, Bleomycin, Gramicidin oder auch Tyrocidin. Die Synthese dieser verschiedenen NRPS-Produkte erfolgt über einen modularen Protein-Templat-Mechanismus [148]. Hierbei sind die NRPS in einzelne strukturell weitgehend unabhängige Module eingeteilt, die ihrerseits wieder in kleinere Untereinheiten, die Domänen, eingeteilt werden können [149]. Jedes Modul ist dabei für den Einbau einer bestimmten Aminosäure verantwortlich, wobei die Anzahl und Anordnung der Module innerhalb einer Peptidsynthetase die Primärstruktur des Peptidproduktes bestimmt. Die einzelnen Domänen sind ihrerseits für die Aktivierung (A-Domäne) und den Weitertransport (PCP-Domäne, engl. für peptidyl carrier protein) einer bestimmten Aminosäure, sowie für die Kondensation (C-Domäne) mit der Aminosäure des benachbarten Moduls zuständig. Die Aminosäuren sind für die jeweilige Kondensationsreaktion als Thioester über einen 4'-Phosphopantetheinarm (Ppant-Arm) an die PCP-Domäne gebunden. Dieser muss zunächst in einer post-translationalen Modifikationsreaktion von CoA auf einen konservierten Serinrest der PCP-Domäne übertragen werden [150]. Diese von den sogenannten Phosphopantetheintransferasen katalysierte Reaktion, kann auch für die Modifikation von Proteinen verwendet werden, indem ein PCP-Fusionsprotein mit verschiedenen CoA-Derivaten kovalent modifiziert wird (vgl. Abschnitt 1.3.3) [51]. Die Substratbindestelle wird dabei jedoch für den weiteren Reaktionsverlauf blockiert, so dass das Enzym durch diese Modifikation inaktiviert wird. Aus diesem Grund sollte hier die Cys-tag Proteinmodifikationstechnik zur regioselektiven Modifikation der nicht-ribosomalen Peptidsynthetase TycA verwendet werden. Dieses erste Modul aus dem Tyrocidin-Biosyntheseapparat ist für den Einbau der ersten Aminosäure des zyklischen Deka-peptids Tyrocidin verantwortlich [151]. Es besteht aus drei Domänen, die für die Aktivierung (A-

Domäne), Bindung (PCP-Domäne) und Epimerisierung zum D-Stereoisomer (E-Domäne) von Phenylalanin verantwortlich sind. Das Enzym besteht aus 1088 aa und ist 122,7 kDa groß. Das Vorhandensein von 5 Cysteinseitenketten verhindert ebenfalls die regioselektive Modifikation durch herkömmliche Cysteinbiokonjugation und stellt allein schon wegen der Größe des Proteins ein herausforderndes Beispiel zur regioselektiven Cys-tag Modifikation dar. Da in diesem Fall auch die enzymatische Aktivität des modifizierten Spleißproduktes bestimmt werden sollte, wurde eine tag-Strategie entwickelt, die eine simple zweistufige Reinigung des Spleißproduktes ermöglichte. Hierfür wurde TycA mit GyrA<sup>N</sup>-FKBP fusioniert und zusätzlich ein N-terminaler *Strep*-tag II angefügt. Der C-terminale His<sub>6</sub>-tag wurde durch Punktmutations-PCR entfernt, sodass letztendlich N-terminales Fusionsprotein **19** (Strep-TycA-GyrA<sup>N</sup>-FKBP, 152 kDa) erhalten wurde. Durch eine *trans*-Proteinspleißreaktion mit dem vorher beschriebenen modifizierten Cys-tag-Konstrukt **16(IAF)** (MBP-GyrA<sup>C</sup>-Cys(IAF)-His<sub>6</sub>), entstand somit das Spleißprodukt Strep-TycA-Cys(IAF)-His<sub>6</sub>, (kurz: TycA(IAF)), das als einziges Protein beide Reinigungs-tags (His<sub>6</sub>-tag und Strep-tag) besaß. Diese Reaktion ist mitsamt der verwendeten Konstrukte in Abb. 42 a) schematisch dargestellt.

Das N-terminale Fusionsprotein wurde in *E. coli* produziert und aus der löslichen Fraktion nach Zellaufschluss über eine Strep-Tactin-Matrix gereinigt (3.2.3.3). Für die *trans*-Proteinspleißreaktion wurde Fluorescein-modifiziertes Cys-tag Protein zugegeben und beide Proteine in einem Volumen von 1 mL und einer Konzentration von jeweils 10 µM in Spleißpuffer bei 25°C inkubiert. Der Erfolg der Spleißreaktion wurde dabei auf einem SDS-PAGE Gel analysiert (Abb. 42 b). Dabei konnte ermittelt werden, dass die Ausbeute an Spleißprodukt **TycA(IAF)** (126,2 kDa) nach Ablauf der Reaktion in etwa 60 % betrug. Zur Reinigung des Spleißproduktes wurde der komplette Reaktionsansatz anschließend auf eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Chromatographiesäule geladen (Spur 1 im SDS-PAGE Gel in Abb. 42 c). Dabei wurden sowohl restliches N-terminales Fusionsprotein **19**, als auch beide Inteinprodukte (**17** & **20**) im Durchlauf der Säule gefunden und konnten so abgetrennt werden. Die restlichen vorhandenen Proteine blieben auch nach Waschschritten mit Puffer mit steigenden Imidazol Konzentrationen gebunden und konnten schließlich mit Elutionspuffer mit 250 mM Imidazol eluiert werden (Spur 2). Die Elutionsfraktionen wurden vereinigt und auf eine Strep-Tactin Säule gegeben. Dabei blieb nur das Spleißprodukt gebunden, alle anderen Proteine konnten im Durchfluss und durch mehrere Waschschriffe entfernt werden (Spur 3 & 4). Gereinigtes Spleißprodukt konnte anschließend mit Puffer mit 2 mM Desthiobiotin (siehe Abschnitte 3.2.3.3 & 3.3.3.4) eluiert werden (Spur 5 & 6). Der Verlauf dieser zweistufigen Reinigungsprozedur ist in Abb. 42 c) zu sehen.

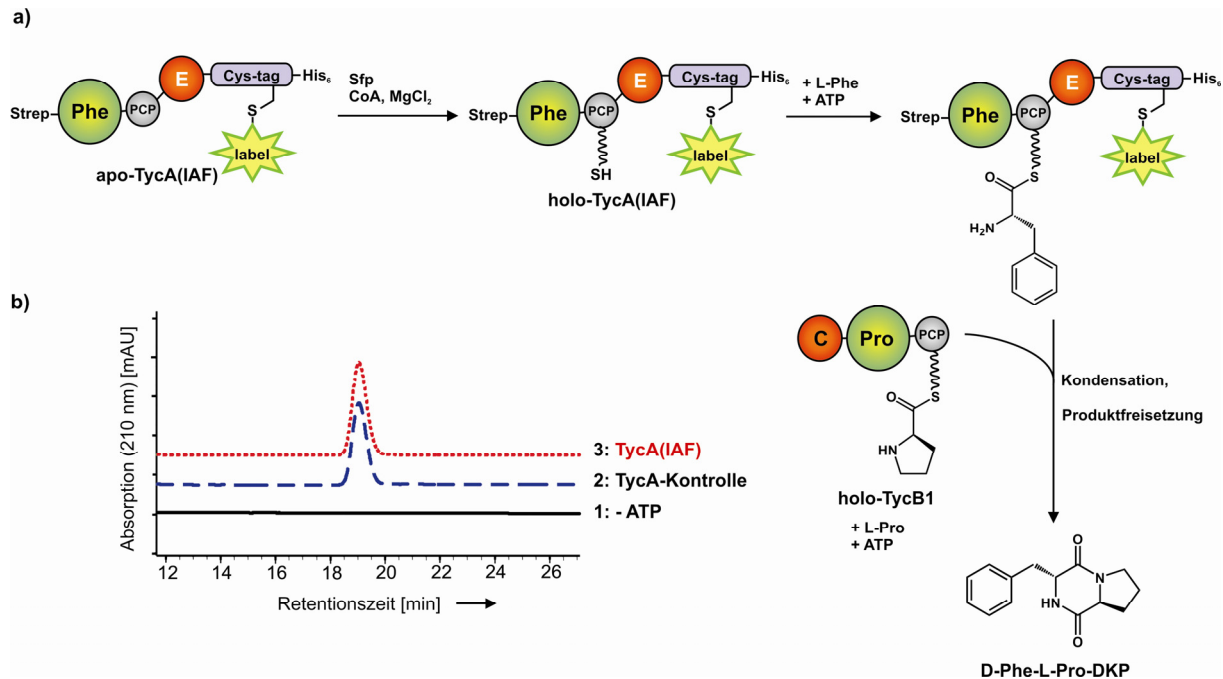




**Abbildung 42: Herstellung von selektiv Fluorescein-modifizierter Multi-Domänen NRPS TycA.** a) Die schematische Darstellung der Reaktion zeigt alle Konstrukte mitsamt der hier angewandten tag-Strategie. Dabei hatte nur das Spleißprodukt **TycA(IAF)** sowohl einen His<sub>6</sub>-, als auch einen Strep-tag und konnte über zwei aufeinander folgende Chromatographieschritte gereinigt werden. b) Coomassie Brilliant Blau gefärbtes und unter UV-Licht photographiertes SDS-PAGE Gel der *trans*-Proteinspleißreaktion, wobei deutlich die Bildung von fluoreszierenden Spleißprodukt **TycA(IAF)** erkennbar ist. Auch alle anderen Produkte konnten identifiziert werden. c) SDS-PAGE Gel Analyse der Reinigung des Spleißproduktes. Der gesamte Reaktionsansatz wurde auf eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Chromatographiesäule geladen und nach Waschen konnten alle Proteine bis auf die Proteine **19** & **17** eluiert und auf eine Strep-Tactin-Säule gegeben werden. Nach Waschen konnte hierbei sauberes modifiziertes Spleißprodukt **TycA(IAF)** eluiert werden. (Spur 1: Durchlauf und Spur 2: Eluat der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule; Spur 3: Durchlauf; Spur 4: Waschschritt und Spur 5 & 6: Elutionsfraktionen der Strep-Tactin-Säule.)

Das gereinigte Spleißprodukt aus Spur 6 in Abb. 42 c) wurde gegen Assaypuffer dialysiert und stand anschließend für den Aktivitätsassay zur Verfügung (für Details siehe Abschnitt 3.3.4.4). Zur Messung der Enzymaktivität wurde die Bildung des Dipeptids D-Phe-L-Pro untersucht [152]. Dieses wird durch TycA und dem nächsten Modul des Biosynthese-Apparates von Tyrocidin (TycB1) gebildet. TycB1 besteht aus einer Kondensationsdomäne, einer Adenylierungsdomäne und einer PCP-Domäne und ist für die Aktivierung und Bindung von Prolin verantwortlich. Durch Kondensation des epimerisierten Phenylalanins mit Prolin bildet sich zunächst das lineare Dipeptid, das noch an den Ppant-Arm der PCP-Domäne des TycB1-Moduls gebunden ist. Dabei greift die Aminogruppe von Prolin die als Thioester aktivierte Carbonylgruppe des Phenylalanins nukleophil an. Wegen des relativ hohen Anteils der Xaa-Pro-Peptidbindung in der *cis*-Konformation wird das Dipeptid jedoch relativ schnell durch Zyklisierung freigesetzt, wobei in einer spontanen, nicht Enzym-katalysierten Reaktion D-Phe-L-Pro-Diketopiperazin (DKP, siehe Abb. 43) gebildet wird [130]. Durch diese Abspaltung stehen die Enzyme wieder für einen neuen Elongationsschritt zur Verfügung. Dazu musste zunächst modifiziertes TycA, genauso wie rekombinant hergestelltes und

gereinigtes TycB1 post-translational mit der prosthetischen Gruppe Ppant modifiziert werden. Dafür wurde jeweils 1  $\mu\text{M}$  Enzym mit 100  $\mu\text{M}$  CoA und 25 nM Phosphopantetheintransferase Sfp für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde auf die gleiche Weise rekombinant hergestelltes unmodifiziertes TycA-His<sub>6</sub> in die aktive holo-form überführt. DKP-Bildung wurde nun durch Zugabe von ATP (2 mM) zu einer Mischung aus holo-TycA (500 nM) mit holo-TycB1 (2,25  $\mu\text{M}$ ) zusammen mit den Substraten Phenylalanin und Prolin (je 1 mM) in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{L}$  gestartet. Der Reaktionsansatz wurde anschließend für 2h bei 37°C inkubiert. Negativkontrollen wurden analog, allerdings ohne ATP durchgeführt. Es wurde ein 4,5facher Überschuss an TycB1 eingesetzt, da in früheren Arbeiten gezeigt wurde, dass ein Überschuss an TycB1 Akzeptor gegenüber dem TycA Donor die Produktivität und Geschwindigkeit der Reaktion deutlich steigern konnte [153]. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mL Methanol gestoppt und die Enzyme dadurch ausgefällt. Die Abtrennung erfolgte durch Zentrifugation, wonach der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Die Flüssigkeit wurde daraufhin durch Gefriertrocknung entfernt und die Reste in 100  $\mu\text{L}$  30 % (v/v) Methanol gelöst. Die einzelnen Reaktionsprodukte wurden anschließend mittels HPLC über eine C18-Säule unter Verwendung eines isokratischen Gradienten getrennt und analysiert (3.3.4.4). Gebildetes DKP konnte dabei nur in Gegenwart von ATP als Peak bei einer Retentionszeit von 18,7 min durch Detektion bei einer Wellenlänge von 210 nm beobachtet werden (Abb. 43). Dieser Peak wurde aufgefangen und massenspektrometrisch analysiert. Dadurch konnte die DKP-Bildung anhand der Masse von  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 245 \text{ m/z}$  eindeutig nachgewiesen werden. Durch Integration des Produktpeaks konnte außerdem gezeigt werden, dass die DKP-Bildung unabhängig davon war, ob Cys-tag modifiziertes oder rekombinant hergestelltes unmodifiziertes TycA eingesetzt wurde. In allen Kontrollreaktionen, bei denen entweder ATP, eine Substrataminosäure oder eines der Enzyme weggelassen wurde, konnte dagegen keine Produktbildung beobachtet werden. Das Prinzip des Aktivitätstests, sowie die Chromatogramme der HPLC-Analyse sind in Abb. 43 dargestellt.



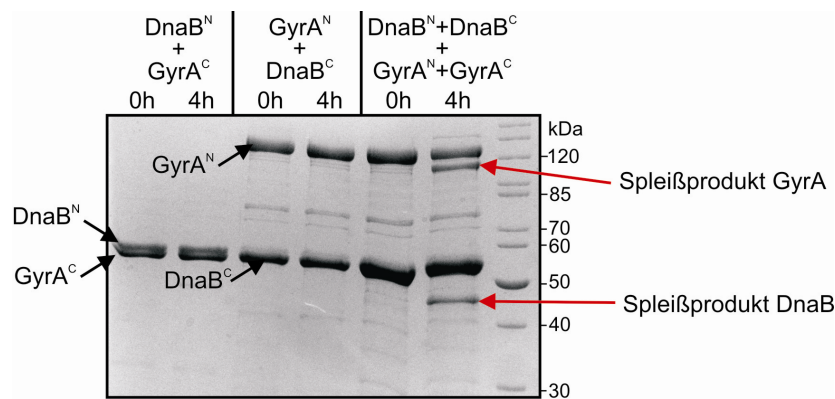
**Abbildung 43: Prinzip der DKP-Bildung und Diagramm der HPLC-Analyse.** a) Nach Herstellung von selektiv modifiziertem TycA(IAF) muss dieses zunächst in die aktive holo-Form überführt werden. Dies geschieht durch eine post-translationale Reaktion, wodurch der Ppant-Arm Sfp-katalysiert von CoA auf die PCP-Domäne übertragen wird. Nach der Beladung von holo-TycA mit Phenylalanin und von TycB1 mit Prolin kommt es zur Kondensation der beiden Aminosäuren und zur abschließenden Freisetzung des zyklischen DKP-Produktes. b) Das HPLC-Diagramm zeigt, dass die DKP-Produktpeaks bei einer Retentionszeit von 18,7 min auftraten und dass die Größe des Peaks unabhängig davon war, ob Cys-tag modifiziertes TycA(IAF) (Spur 3) oder eine rekombinant hergestellte TycA-Kontrolle (Spur 2) eingesetzt wurde. Keine DKP-Bildung wurde beobachtet, wenn ATP bei der Reaktion weggelassen wurde (Spur 1).

Der Nachweis der Enzymaktivität der Fluorescein-modifizierten NRPS TycA zeigte, dass die Prozedur aus Cysteinbiokonjugation und *trans*-Proteinspleißen hervorragend zur Herstellung verschiedenartiger modifizierter Proteine geeignet ist. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl schwer lösliche (hGH), als auch große Multi-Domänen-Proteine (TycA) spezifisch, mit großen Ausbeuten und ohne Verlust der Enzymaktivität modifiziert werden konnten. Diese Ergebnisse, zusammen mit dem Vorhandensein von zahlreichen Cystein-reaktiven Modifikationsreagenzien, machen diesen Ansatz zu einer vielseitig anwendbaren Technologie.

#### 4.4.5 Orthogonalität der beiden gespaltenen Inteine

Für den Einsatz des neuen gespaltenen *Mxe* GyrA Inteins in mehrstufigen Spleißreaktionen, z.B. in einer Mehrfragmentligation, wurde untersucht, ob das GyrA Intein orthogonal zu dem zuvor untersuchten DnaB Intein ist. Orthogonalität bedeutet in diesem Fall die Unabhängigkeit beider Inteinsysteme voneinander, d.h. dass kein Spleißprodukt durch eine heterologe Kombinationen zweier Inteinfragmente unterschiedlicher Inteine gebildet wird,

jedoch beide Spleißprodukte gebildet werden, wenn beide Inteine nebeneinander vorliegen, also alle vier Konstrukte ( $\text{DnaB}^{\text{N}}$ ,  $\text{DnaB}^{\text{C}}$ ,  $\text{GyrA}^{\text{N}}$  und  $\text{GyrA}^{\text{C}}$ ) in einem Reaktionsansatz miteinander gemischt werden. Damit die einzelnen Spleißprodukte voneinander unterschieden werden konnten, wurden die Konstrukte so gewählt, dass für das DnaB Inteinssystem das Spleißprodukt MBP-Cys-His<sub>6</sub> (45 kDa) und für das GyrA Inteinssystem das Spleißprodukt Strep-TycA-Cys-His<sub>6</sub> (126 kDa) gebildet wurden. Darum wurde nun ein Reaktionsansatz bestehend aus  $\text{DnaB}^{\text{N}}$  (MBP- $\text{DnaB}^{\text{N}}$ -His<sub>6</sub>, 56,4 kDa) und  $\text{GyrA}^{\text{C}}$  (MBP- $\text{GyrA}^{\text{C}}$ -Cys-His<sub>6</sub>, 53,3 kDa) und ein zweiter mit der Kombination aus  $\text{GyrA}^{\text{N}}$  (Strep- $\text{GyrA}^{\text{N}}$ -FKBP-His<sub>6</sub>, 151,1 kDa) und  $\text{DnaB}^{\text{C}}$  (MBP- $\text{DnaB}^{\text{C}}$ -Cys-His<sub>6</sub>, 50,3 kDa) für 4h bei 25°C inkubiert. Ebenso wurden in einer dritten Reaktion alle vier Konstrukte miteinander gemischt und ebenfalls für 4h bei 25°C inkubiert. Das Ergebnis (Abb. 44) zeigt eindeutig, dass bei keiner der beiden heterologen Kombinationen Spleißprodukt gebildet wurde, während durch Inkubation aller vier Konstrukte beide Spleißprodukte entstanden. Wegen der geringen Massenunterschiede der einzelnen Edukte und Produkte, konnten nicht alle Proteinbanden auf diesem SDS-PAGE Gel aufgelöst werden, d.h. einige Banden liefen auf derselben Höhe.



**Abbildung 44: Orthogonalität des GyrA Inteins zum DnaB Intein.** Bei keiner der beiden heterologen Kombinationen aus dem DnaB Intein und dem GyrA Intein wurde Spleißprodukt gebildet. Nur wenn alle 4 Inteinfragmente zusammen gemischt wurden, bildeten sich die beiden Spleißprodukte MBP-Cys-His<sub>6</sub> und Strep-TycA-Cys-His<sub>6</sub>. Die verwendeten Konstrukte waren: MBP- $\text{DnaB}^{\text{N}}$ -His<sub>6</sub> (56,4 kDa), MBP- $\text{DnaB}^{\text{C}}$ -Cys-His<sub>6</sub> (50,3 kDa), Strep-TycA- $\text{GyrA}^{\text{N}}$ -FKBP-His<sub>6</sub> (151,1 kDa) und MBP- $\text{GyrA}^{\text{C}}$ -Cys-His<sub>6</sub> (53,3 kDa).

## 5 Diskussion

### 5.1 Generierung von künstlich gespaltenen Inteinen

Nach der Identifizierung des ersten natürlich gespaltenen Inteins im Jahr 1998 (*Ssp* DnaE Intein, Wu *et al.* [87, 99]), gab es vermehrt Bestrebungen, in der Natur vorkommende Maxi- oder Mini-Inteine künstlich zu spalten, um daraus *trans*-spleißende Inteine zu generieren. Als besonders geeignet erschien in diesem Zusammenhang die Spaltung von Maxi-Inteinen zwischen den beiden N- und C-terminalen Spleißregionen, indem entweder in der Homing-Endonukleasedomäne geschnitten, oder diese mehr oder weniger komplett entfernt wurde. Mit dieser Methode konnten zwar einige *trans*-spleißende Inteine generiert werden; allerdings führte die Spaltung dabei meistens zum Verlust der Spleißaktivität, da die beiden komplementären Inteinfragmente keine natürliche Affinität zueinander besaßen.

Der einfachste Weg aus den beiden unabhängig voneinander vorliegenden inaktiven Inteinteilen ein aktives Intein zu bilden, bestand in der Denaturierung der beiden einzelnen Proteine in Puffer mit 8 M Harnstoff oder 6 M Guanidinium Hydrochlorid und anschließender gemeinsamer Rückfaltung. Auf diese Weise konnte für einige künstlich gesplattene Inteine Spleißaktivität beobachtet werden [82, 105, 154]. In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass auch der Einsatz von Affinität-vermittelnden Domänen zur Bildung eines aktiven Inteins aus zwei Inteinfragmenten führte. Beispielsweise ging beim *Sce* VMA Intein die gesamte Spleißaktivität durch die Spaltung in der Endonukleasedomäne verloren und konnte erst durch zusätzliche Fusionen der beiden Inteinhälften mit Calmodulin und dessen Zielpeptid M13 wiederhergestellt werden [107]. Dieser Ansatz konnte noch durch die Entwicklung eines induzierbaren Systems erweitert werden. Zu diesem Zweck wurde das VMA Intein gespalten und die beiden VMA Inteinhälften mit den beiden Heterodimerisierungsdomänen FKBP und FRB fusioniert. Diese assoziieren erst nach Zugabe des Liganden Rapamycin, wodurch das aktive Intein gebildet wird. Mit dieser Technik, dem sogenannten konditionellen Proteinspleißen (CPS, engl. conditional protein splicing) konnte u.a. eine auto-inhibierte Proteinkinase aktiviert werden [155], oder auch Proteinspleißen in Säugetierzellen gezeigt werden [119].

Diese beiden Methoden zur Aktivierung von künstlich gespaltenen Inteinen hatten allerdings den Nachteil, dass einerseits die generierten Fusionsproteine durch das Verwenden der Heterodimerisierungsdomänen recht groß waren. Zum anderen verhinderte besonders das

Denaturieren und Rückfalten der Fusionsproteine den Einsatz von zahlreichen Proteinen, deren Aktivität und/oder Struktur durch diesen Prozess irreversibel verloren ging.

Dieses Problem konnte erst durch das Auffinden des ersten künstlich gespaltenen Inteins, dass auch unter nativen Bedingungen Spleißaktivität besaß, umgangen werden [120]. Hierbei bildeten die beiden Inteinfofragmente des *Ssp* DnaB Inteins spontan das aktive Intein, wenn sie als Bestandteil zweier separater Proteine produziert, gereinigt und hinterher in einer *trans*-Proteinspleißreaktion eingesetzt wurden. Diese Eigenschaft konnte auch für den hier beschriebenen Ansatz der Cys-tag Modifikation von nativen Proteinen ausgenutzt werden.

Eine weitere vorteilhafte Eigenschaft die hierfür ausgenutzt wurde ist, dass sich Inteine im Allgemeinen durch eine recht hohe Toleranz gegenüber den Exteinsequenzen auszeichnen, wodurch sie auch in heterologer Umgebung ihre Spleißaktivität weitestgehend beibehalten. Allerdings reagieren die meisten Inteine relativ empfindlich auf Veränderungen der ersten zwei bis drei Aminosäuren der N- und C-Exteine in direkter Nachbarschaft zu den Spleißstellen [83]. Aus diesem Grund können zwar zahlreiche N- und C-Exteine für eine *trans*-Proteinspleißreaktion verwendet werden, jedoch müssen in den allermeisten Fällen die ersten zwei bis drei natürlichen Aminosäuren bei der Herstellung der künstlichen Konstrukte beibehalten werden. Der Einsatz von verschiedenen Inteinen in diversen heterologen Exteinumgebungen, auch durch die Verwendung in kommerziellen Vektoren, hat zwar dazu geführt, dass inzwischen recht gut bekannt ist, welche Exteinamino­säuren toleriert werden, und welche invariant sind. Auf der anderen Seite ist jedoch relativ wenig über die Toleranz hinsichtlich der Positionen zwischen den beiden Spleißregionen bekannt. So ist es durchaus plausibel, dass durch die Spaltung eines intakten Proteins, die einzelnen Fragmente durch erhöhte Exposition von zuvor verborgenen, hydrophoben Aminosäureseitenketten eine geringere Löslichkeit zeigen. Dies konnte z.B. in dieser Arbeit beim DnaB Intein beobachtet werden. Dabei zeigte sich, dass eine Fusion des DnaB<sup>N</sup>-Fragmentes mit anderen Proteinen in den meisten Fällen dazu führte, dass die entsprechenden Fusionsproteine unlöslich waren. Besonders auffallend war, dass auch eigentlich gut lösliche Proteine wie das Thioredoxin oder die  $\beta$ -Laktamase zur Bildung von unlöslichen Aggregaten neigten, wenn sie als N-Exteine mit dem DnaB<sup>N</sup>-Fragment fusioniert wurden.

Als Alternative wurde nach einem Intein gesucht, das neben einer hohen Exteintoleranz, entsprechend weniger Tendenzen zur Bildung unlöslicher Fusionsproteine mit den Inteinfofragmenten haben sollte.

Als vielversprechender Kandidat wurde dafür das natürliche *Mxe* GyrA Mini-Intein ausgewählt, das statt der Endonukleasedomäne nur einen kurzen flexiblen Linker besitzt.



Einfluss auf die Löslichkeit und/oder Spleißaktivität ausübte. Während beim DnaB Intein die Konstrukte in der Regel unlöslich aber spleißaktiv waren, führte dies beim GyrA Intein zwar zu gut löslichen, allerdings inaktiven Konstrukten. Nur durch die Verwendung einer stabilisierenden Domäne, wie der FKBP-Domäne, konnten stabile, gut lösliche und spleißaktive N-terminale Inteininfusionsproteine erhalten werden.

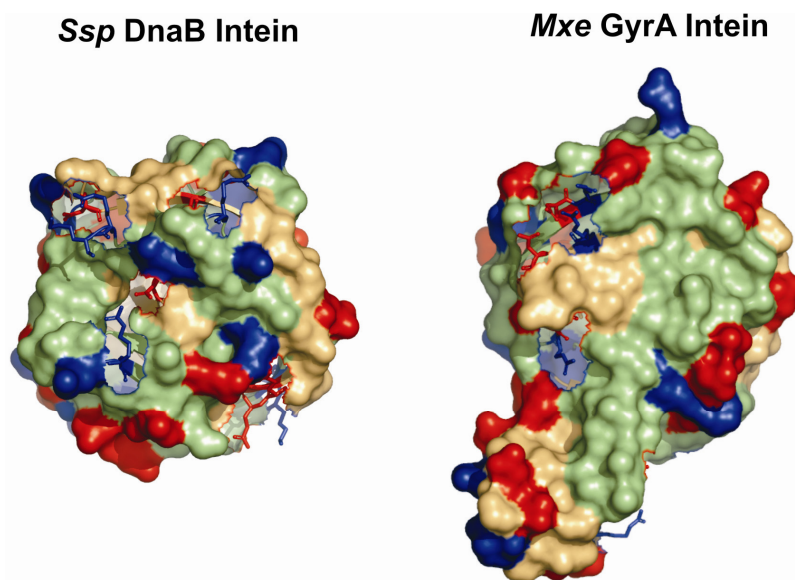
### 5.2 Vergleich der Ladungsverteilung der einzelnen Inteinfragmente

Neben der Etablierung zweier gespaltener Inteinsysteme konnte in dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass beide Inteinsysteme orthogonal zueinander sind, d.h. dass die einzelnen Inteinfragmente nicht mit den komplementären Fragmenten des jeweiligen anderen Inteins interagieren. Dies ist besonders interessant, wenn man davon ausgeht, dass hauptsächlich elektrostatische Kräfte für die starken Interaktionen zwischen den N- und C-terminalen Spleißregionen verantwortlich sind, weil dabei auch heterologe Kombinationen, die entgegengesetzte Ladungen tragen, miteinander in Wechselwirkung treten könnten. So konnte beispielsweise für das natürlich gespaltene *Ssp* DnaE Intein eine starke Interaktion der beiden komplementären Inteinteile mit einer Gleichgewichtsdissoziationskonstante von  $K_d = 26$  nM und einer langsamen Dissoziationsgeschwindigkeit von nur  $k_{\text{off}} = 1,2 \text{ s}^{-1}$  gezeigt werden. Für die Assoziation der beiden Inteinfragmente wurde dabei eine sehr hohe Geschwindigkeit von  $k_{\text{on}} = 2,8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ermittelt, die nahe an die Diffusionsgeschwindigkeit herankommt [98]. Hierbei wurde anhand der Aminosäuresequenz abgeleitet, dass beide DnaE-Inteinfragmente gegensätzliche isoelektrische Punkte und damit auch entgegengesetzte Ladungen bei pH 7,0 besitzen. In diesem Beispiel wurde das natürlich gespaltene *Ssp* DnaE Intein mit den pI-Werten 4,3 (DnaE<sup>N</sup>) und 9,4 (DnaE<sup>C</sup>), sowie das künstlich gespaltene *Sce* VMA Intein mit den entgegengesetzten pI-Werten 9,5 (VMA<sup>N</sup>) und 4,0 (VMA<sup>C</sup>) miteinander verglichen. Ausgehend von diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass beide Inteine orthogonal zueinander waren und in einer Tandem *trans*-Proteinspleißreaktion unabhängig voneinander eingesetzt werden konnten [98].

Auch für das DnaB Intein wurden entgegengesetzte isoelektrische Punkte von 9,5 für das DnaB<sup>N</sup>- und 3,8 für das DnaB<sup>C</sup>-Fragment berechnet. Die entsprechenden Ladungen bei pH 7,0 waren demnach +6,2 (DnaB<sup>N</sup>) und -7,7 (DnaB<sup>C</sup>). Deshalb konnte auch hier vermutet werden, dass die Bildung des aktiven Inteins hauptsächlich durch elektrostatische Anziehung zustande kommt. Ganz anders verhält es sich dagegen beim GyrA Intein. Für die beiden



Fragmente des gespaltenen GyrA Inteins wurden nämlich recht ähnliche pI-Werte berechnet: 5,5 für GyrA<sup>N</sup> und 5,4 für GyrA<sup>C</sup> was zu den berechneten Ladungen von -3,5 (GyrA<sup>N</sup>) und -3,4 (GyrA<sup>C</sup>) führt. Hierbei kann nicht mehr von starken elektrostatischen Wechselwirkungen der beiden Inteinfragmente ausgegangen werden. In Abb. 46 ist die Ladungsverteilung des DnaB Inteins und des GyrA Inteins gezeigt. Dabei sind die Unterschiede anhand der Färbung der geladenen und ungeladenen Seitenketten zu erkennen. Das N-terminale Inteinfragment ist dabei jeweils grünlich und das C-terminale Inteinfragment entsprechend gelblich dargestellt. Auffallend sind vor allem die geladenen Aminosäureseitenketten (positiv geladene Seitenketten = blau, negativ geladene Seitenketten = rot), die beim DnaB Intein hauptsächlich an den Berührungspunkten der beiden Inteinfragmente zu sehen sind (offene Darstellung mit Stäbchenmodell der Seitenketten), während sie beim GyrA Intein häufig auf derselben Peptidkette liegen.



**Abbildung 46: Ladungsverteilung des *Ssp* DnaB Inteins und des *Mxe* GyrA Inteins.** N-terminale Inteinfragmente sind dabei grünlich und C-terminale Inteinfragmente gelblich dargestellt. Außerdem sind positiv geladene (RK, blau) und negativ geladene (DE, rot) Aminosäureseitenketten hervorgehoben. Die Berührungspunkte der beiden Inteinfragmente mit entgegengesetzt geladenen Aminosäuren sind offen und mit dem Stäbchenmodell der Seitenketten dargestellt.

Aufgrund der Ladungsverteilung und der nahezu identischen isoelektrischen Punkte der beiden GyrA Inteinfragmente, konnte nicht von starken elektrostatischen Wechselwirkungen ausgegangen werden. Für den Fall, dass die Bildung des aktiven Inteins durch die Assoziation der beiden Fragmente geschwindigkeitsbestimmend ist, müsste die Reaktion deutlich langsamer verlaufen. Dies entspricht jedoch nicht den Ergebnissen, da zwar die Bildung von Spleißprodukt wesentlich langsamer verlief, aber das Intermediat der Reaktion sehr schnell

gebildet wurde und dies ebenso die Assoziation der Inteinfragmente voraussetzt. Daraus kann geschlossen werden, dass nicht allein elektrostatische Wechselwirkungen für die schnelle Assoziation der beiden Inteinhälften verantwortlich sind, sondern vor allem für das GyrA Intein auch hydrophobe Wechselwirkungen maßgeblich daran beteiligt sind. Diese Schlussfolgerung erscheint auch im Zusammenhang mit dem VMA Intein logisch. Wie zuvor beschrieben, besitzen die beiden Inteinfragmente des künstlich gespaltenen VMA Inteins zwar entgegengesetzte Ladungen und isoelektrische Punkte, zeigen aber in einer *trans*-Proteinspleißreaktion keine Spleißaktivität. Dies wäre allerdings zu erwarten, wenn einzig elektrostatische Kräfte für die Bildung des aktiven Inteincomplexes verantwortlich wären. Zur besseren Übersicht sind die hier diskutierten isoelektrischen Punkte und Ladungen bei pH 7,0 der einzelnen Inteine in Tabelle 9 zusammengefasst.

**Tabelle 9: Vergleich der isoelektrischen Punkte und Ladungen bei pH 7,0 für verschiedene Inteinfragmente.**

Intein	Fragment	pI	Ladung bei pH 7,0
<i>Ssp</i> DnaB Intein	DnaB <sup>N</sup>	9,5	+6,2
	DnaB <sup>C</sup>	3,8	-7,7
<i>Mxe</i> GyrA Intein	GyrA <sup>N</sup>	5,5	-3,5
	GyrA <sup>C</sup>	5,4	-3,4
<i>Sce</i> VMA Intein	VMA <sup>N</sup>	9,3	7,5
	VMA <sup>C</sup>	5,6	-1,8
<i>Ssp</i> DnaE Intein	DnaE <sup>N</sup>	4,2	-13,6
	DnaE <sup>C</sup>	9,3	+2,05

### 5.3 Bildung des verzweigten Intermediates

Das Auftreten einer zusätzlichen Bande in SDS-PAGE Gelen von Spleißreaktionen des gespaltenen GyrA Inteins führte zur Vermutung, dass es sich dabei um eine Zwischenstufe der Spleißreaktion handeln könnte. Sowohl die Höhe auf der die Bande lief, als auch die Tatsache, dass sowohl der His<sub>6</sub>-tag, als auch der Cys-tag vorhanden waren, deutete auf das verzweigte Intermediat der Spleißreaktion hin. Auch im Falle des *Psp*-GBD Pol Inteins konnte zuvor schon die Identität des verzweigten Intermediates nachgewiesen werden. Dabei konnte Xu *et al.* zeigen, dass es sich um eine kurzlebige Spezies handelt, die unmittelbar zu

Beginn der Spleißreaktion entsteht, im weiteren Verlauf wieder abnimmt und am Ende nicht mehr nachgewiesen werden kann [78]. Des Weiteren konnte durch pH-abhängige Untersuchungen die Reversibilität der Bildung des verzweigten Intermediates aus den beiden Eduktproteinen nachgewiesen werden [79]. Eine N-terminale Aminosäuren-Sequenzanalyse durch den Edman-Abbau zeigte außerdem, dass die untersuchte Spezies zwei freie N-Termini besaß. Ebenfalls konnte anhand von Mutationsstudien belegt werden, dass die Bildung des verzweigten Intermediates nur abläuft, wenn beide Nukleophile, die maßgeblich für die N-S-Acylumlagerung und die Umesterung verantwortlich sind, intakt sind [77]. Ferner führte die Mutation der vorletzten Inteinaminoäure, des Histidins, zu einer Akkumulation des verzweigten Intermediates, weil dadurch die Weiterreaktion der Zwischenstufe, also die Zyklisierung zum Succinimid, verhindert wurde.

Für andere Inteine konnte diese Zwischenstufe bisher nicht so eindeutig nachgewiesen werden, was wohl in diesen Fällen auf eine schnellere Asparaginzyklisierung zurückzuführen ist. Für das DnaE Intein konnte dafür eine Geschwindigkeitskonstante von  $1,9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  ermittelt werden [95], was nur etwas langsamer ist, als die Geschwindigkeitskonstante der gesamten Spleißreaktion ( $6,6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ). Da für das GyrA Intein diese Zwischenstufe anscheinend wesentlich stabiler ist, wurde daraus abgeleitet, dass in diesem Fall die nachfolgende Asparaginzyklisierung deutlich langsamer abläuft und sich daher geschwindigkeitsbestimmend auf die Reaktion auswirkt. Allerdings ist der Grund für die Stabilität des gespaltenen GyrA Inteins bzw. für die deutlich langsamere Asparaginzyklisierung noch nicht geklärt. Aufgrund der relativ ausgeprägten Sequenzhomologie insbesondere im Bereich der Spleißmotive konnte kein auffälliges Sequenz- oder Strukturmerkmal identifiziert werden, das diesen Befund erklären könnte (vgl. Abb. 45). Der einzige auffallende Unterschied ist, dass im GyrA Intein ein sekundärer Alkohol (Threonin) als Nukleophil an der C-terminalen Spleißstelle verwendet wird, während die meisten anderen untersuchten Inteine einen primären Alkohol (Serin), wie das DnaB Intein, oder ein Thiol (Cystein), wie z.B. das VMA Intein an dieser Stelle besitzen. Allerdings ist dieser Rest nicht direkt an der Asparaginzyklisierung beteiligt. Vorstellbar wäre zumindest, dass die zusätzliche Methylgruppe des Threonins, den Angriff der Aminogruppe des Asparagins auf die Carbonylgruppe der Peptidbindung sterisch hindert, so dass diese nur deutlich langsamer ablaufen kann. Allerdings steht eine eindeutige Identifikation dieser transienten Spezies noch aus.

Eine ähnliche Argumentation wurde als Erklärung für die Invarianz der ersten paar flankierenden Aminosäuren der N- und C-Exteinssequenzen benutzt, obwohl diese nicht direkt

an der Spleißreaktion beteiligt sind (das Nukleophile an Position +1 ausgenommen). Dabei wurde beobachtet, dass Proteinspleißreaktionen von Inteinen in unnatürlicher Umgebung zumeist langsamer ablaufen und zu mehr Hydrolyseprodukten führen, als von Inteinen in einer nativen Exteinumgebung [83, 88, 156, 157]. Aufgrund der Temperaturabhängigkeit der Inteine mit artifiziellen Exteinsequenzen, wurde zudem vermutet, dass auch die Faltung des Inteins durch diesen Eingriff gestört wird [158]. Dadurch, dass alle drei Nukleophile, die an der Spleißreaktion beteiligt sind, direkt an den beiden Spleißstellen zu finden sind, könnten benachbarte unnatürliche Aminosäuren die Spleißreaktion inhibieren, indem sie chemisch oder sterisch destabilisierend auf die aktiven Zentren wirken. So ist z.B. die Aminosäureseitenkette an Position -1 im N-Extein nicht direkt an der Spleißreaktion beteiligt, dafür stellt aber dessen Carbonyl-Kohlenstoffatom das Ziel für drei der vier nukleophilen Angriffe dar. In systematischen Studien konnte sowohl für das *Sce* VMA, als auch für das *Mxe* GyrA Intein gezeigt werden, dass einige Substitutionen an Position -1 zur Inhibierung der Spleißreaktion führten [156, 159]. Um einen ähnlichen Effekt könnte es sich auch bei der hier beobachteten verlangsamten Succinimidbildung handeln.

Ein anderer Grund könnte eine ungünstige Positionierung des vor dem Asparagin liegenden Histidins sein. Dem Histidin an vorletzter Position im Intein wird eine Hilfsfunktion bei der Asparginzyklisierung, durch Protonierung des Stickstoffs der Peptidbindung an der Spleißstelle, zugesprochen [94, 160]. Durch die Spaltung des Inteins könnte die C-terminale Hälfte des Inteins in soweit fehlgefaltet sein, dass die Positionierung des Histidins relativ zur Peptidbindung nicht optimal ist. Dadurch könnte die Spleißreaktion zwar nach wie vor ablaufen, allerdings mit einer wesentlich langsameren Geschwindigkeit.

## **5.4 Cys-tag Modifikation: Eine neue Methode zur regio- und chemoselektiven Modifikation von Proteinen**

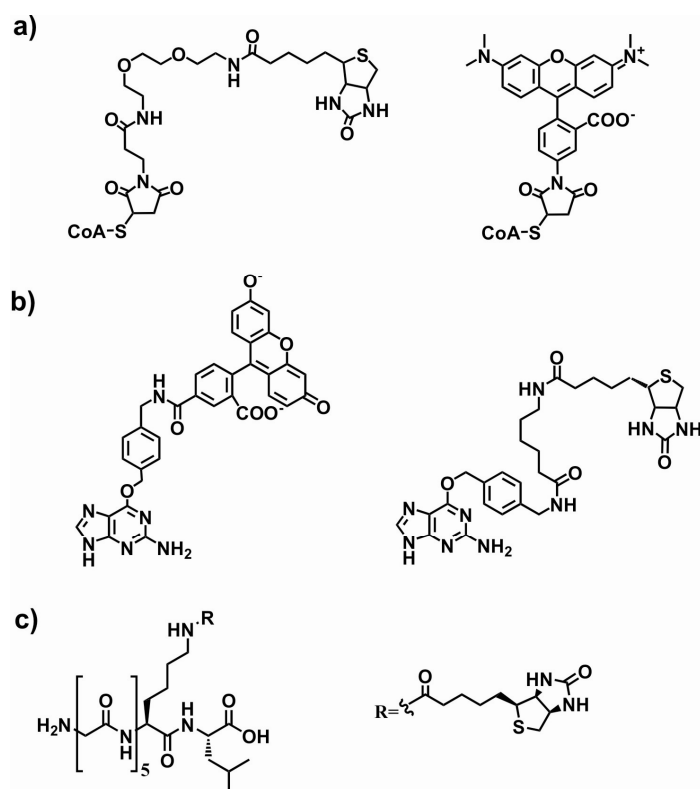
Eine entscheidende Voraussetzung für die Aufklärung von zahlreichen biochemischen Fragestellungen bezüglich der Struktur, Lokalisation, Funktion und Interaktion von verschiedenen Proteinen ist die chemo- und regioselektive Modifikation dieser Proteine mit diversen biophysikalischen Sonden. Zu diesem Zweck wurden zahlreiche Methoden entwickelt, die unterschiedlich selektiv und effektiv sind. Auch in dieser Arbeit wurde eine neue chemo- und regioselektive Methode zur einfachen chemischen Modifikation von Proteinen entwickelt. Hierbei wird in einer zweistufigen Reaktion zunächst ein Cystein in der

Exteinsequenz eines ansonsten Cystein-freien C-terminalen Inteinfragmentes mit Thiol-reaktiven Reagenzien chemisch modifiziert. Dieser modifizierte Cys-tag wird anschließend mittels *trans*-Proteinspleißen auf ein beliebiges Protein, das als Fusion mit dem komplementären N-terminalen Inteinfragment hergestellt wurde, übertragen. Dieser zweistufige Mechanismus soll in diesem Abschnitt mit einigen anderen gängigen Methoden zur Herstellung modifizierter Proteine verglichen und einige der Vor- und Nachteile der verschiedenen Methoden ausgearbeitet werden.

### 5.4.1 Chemoselektivität der Reaktion und verwendbare Reagenzien

Schon allein wegen der großen Auswahl an verwendbaren (kommerziellen) Reagenzien bietet der hier vorgestellte Ansatz ein großes Anwendungspotential. Für die Methode ist zwar eine wichtige Voraussetzung, dass die Reaktion chemoselektiv am einzigen Cystein des Int<sup>C</sup>-Konstruktes stattfindet; jedoch stellte sich in dieser Arbeit heraus, dass sowohl Maleinimide, als auch Iodacetamide für diese Reaktion ausreichend selektiv sind. Dabei konnte insbesondere durch massenspektrometrische Analysen der Reaktionsgemische die Chemoselektivität gezeigt werden, da nur einfach modifizierte Proteine detektiert werden konnten und Cystein-freie Vergleichsproteine unmarkiert blieben. Für beide funktionelle Gruppen gibt es zahlreiche kommerziell zu erwerbende Reagenzien die mit fast beliebigen biophysikalischen Sonden ausgestattet sind. So gibt es neben den schon beschriebenen Fluorophor-, Biotin- und PEG-funktionalisierten Reagenzien, viele weitere funktionalisierte Proben wie z.B. chemische Cross-linker, Maleinimid-beschichtete Platten, Gold-Nanopartikel, polare Reagenzien zur Markierung von Zelloberflächen und zahlreiche weitere Farbstoffe. Die Fülle an erhältlichen Reagenzien, die sich für diese Modifikationsreaktion einsetzen lassen, zusammen mit der Einfachheit mit der diese funktionellen Gruppen in ein beliebiges Protein eingebracht werden können, machen diese Methode noch vielseitiger.

Dies ist besonders interessant im Vergleich zu vielen anderen Techniken mit denen modifizierte Proteine hergestellt werden können und die zum Teil deutlich anspruchsvollere Substrate benötigen. So ist in einigen Fällen, z.B. für die Modifikation mit dem hAGT/SNAP-tag, mit dem PCP/ybbR-tag, oder auch bei der Sortase-vermittelnden Modifikation, die Synthese der Substrate wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Proteinmodifikation. Dies kann jedoch, je nach Substrat und bevorzugter Methode, unterschiedlich kompliziert sein. In Abb. 47 sind einige der Substrate aufgeführt, die für die Sfp-katalysierte [51], die hAGT-katalysierte [54] und die Sortase-vermittelte Modifikation [59] von Proteinen verwendet wurden.



**Abbildung 47: Substratstrukturen von verschiedenen Modifikationstechniken.** a) CoA-Derivate für die Sfp- oder ybbR-katalysierte Modifikation mit Biotin (links) und einem Fluorophor (rechts). b) Benzylguanin-Substrate der hAGT- oder SNAP-tag Modifikation mit Fluorescein (links) und Biotin (rechts). c) Pentaglycinsubstrat für die Sortase-vermittelte Proteinbiotinylierung.

Neben der Cys-tag Technologie kommt nur noch die Sfp- oder ybbR-katalysierte Modifikationstechnik mit einfachen Maleinimidderivaten aus. Für die anderen Methoden werden zum Teil anspruchsvollere und schwerer zu synthetisierende Substrate benötigt. Die hier beschriebene Prozedur der Cysteinbiokonjugation kommt dagegen mit einfachen, in der Regel kommerziell erwerblichen Reagenzien aus und kann daher auch in weniger spezialisierten Laboratorien durchgeführt werden.

#### 5.4.2 Regioselektivität der Reaktion

Von großer Bedeutung ist neben der Chemoselektivität natürlich auch die Regioselektivität der Reaktion. Durch die Affinität der beiden Inteinhälften zueinander und durch die vom aktiven Inteincomplex vermittelte *trans*-Proteinspleißreaktion kommt es zu einer homogenen Modifikation des Zielproteins, indem der modifizierte Cys-tag selektiv mit dem C-Terminus des Zielproteins verbunden wird. Dabei erfolgt die Verknüpfung zwischen Zielprotein und Cys-tag über eine stabile Peptidbindung. Andere herkömmliche Biokonjugationsreaktionen haben dabei das Problem der Regioselektivität, wenn mehr als eine der adressierten Aminosäure im Protein vorhanden sind. Allerdings können auch andere Methoden zur

regioselektiven Modifikation von Proteinen verwendet werden. Neben dem Einsatz von enzymatischen Reaktionen, bei dem ein modifiziertes Substrat auf eine bestimmte Aminosäureseitenkette eine Fusionstags übertragen wird, können auch andere Techniken wie z.B. die sogenannte nonsense-Suppressions-Technik [7] zu diesem Zweck verwendet werden. Dies erfordert jedoch fundierte Kenntnisse im Bereich der Proteinevolutionstechniken und des mikrobiologischen Arbeitens, da dafür ein selektives tRNA/Aminoacyl-tRNA-Synthetasen Paar entwickelt werden muss und kann daher nur in spezialisierten Laboren durchgeführt werden. Wie bei den meisten hier beschriebenen Techniken ist auch in diesem Fall die mehrfache Modifikation eines Proteins mit einer unnatürlichen Aminosäure oder die Modifikation mit mehreren unnatürlichen Aminosäuren besonders schwer zu verwirklichen und erfordert eine aufwendige und komplizierte Herangehensweise.

Der einfachste und wohl auch am häufigsten verwendete Weg zur Herstellung regioselektiv modifizierter Proteine führt über chemische Ligationstechniken, wie die NCL oder die EPL. Durch die Verwendung dieser Ligationstechniken wird vor allem der Vorteil ausgenutzt, dass auch mehrere verschiedene unnatürliche Aminosäuren gleichzeitig, durch die mittels SPPS synthetisierten Peptide, in ein Protein eingeführt werden können. So konnte beispielsweise Crambin aus zwei, bzw. drei Peptidfragmenten zusammengebaut [161], ein funktioneller  $K^+$ -Kanal durch Proteinsemisynthese generiert [138], oder auch die Ribonuklease A und Varianten davon durch EPL synthetisiert werden [162]. Auch das Ras-Protein konnte durch NCL aus drei ungeschützten Peptidbausteinen zusammengesetzt werden und, zusammen mit der durch Ligation zweier Peptide erhaltenen Ras-bindenden Domäne (RBD) des Effektors c-Raf1, untersucht werden. Dadurch konnte schließlich auch die Kinetik der Ras-RBD-Interaktion untersucht werden [163].

### 5.4.3 Weitere Eigenschaften der Reaktion

Ein weiterer Vorteil ergibt sich aus der Sensitivität der Reaktion. Im Gegensatz zu anderen Methoden wie z.B. chemischen Ligationstechniken wie der EPL, die zumeist millimolare Mengen an Reaktionspartner und zusätzlich Thiole in einem großen Überschuss verlangen, können in diesem Fall auch geringe mikromolare Proteinmengen eingesetzt werden. Geringe Mengen an Thiolen, die zur Reduktion des Cysteins des Cys-tags vonnöten sind, können hierbei auch durch andere Reduktionsmittel wie z.B. durch TCEP ersetzt werden. Erwähnenswert sind generell die milden Bedingungen unter denen die Reaktionen ablaufen. Sowohl die Modifikationsreaktion als auch die Spleißreaktion laufen bei neutralem pH-Wert

und bei Raumtemperatur ab, wobei die Modifikationsreaktion auch bei 4°C und entsprechend längerer Reaktionszeit durchgeführt werden kann. Dies ist besonders vorteilhaft im Hinblick auf die Modifikation von empfindlichen Proteinen.

Ebenso günstig dürfte sich für viele Anwendungen die Größe des Cys-tags auswirken. Dabei ist generell wünschenswert, dass die strukturelle und funktionelle Integrität des untersuchten Proteins durch die Modifikation und die Art des Einbaus erhalten bleibt. In der Regel steigt die Wahrscheinlichkeit die Funktion und/oder Struktur eines Proteins zu beeinträchtigen mit der Größe des verwendeten tags, weswegen ein möglichst kleiner Fusionstag am besten für die Herstellung von aktivem modifiziertem Protein geeignet ist. In dieser Arbeit wurde in der Regel ein 12 Aminosäuren langer Cys-tag verwendet (SIRSCGH<sub>6</sub>), wobei auch ein verkürzter Cys-tag ohne den His<sub>6</sub>-tag von nur noch 6 Aminosäuren (SIRSCG) erfolgreich zur Modifikation der  $\beta$ -Laktamase und des Thioredoxins verwendet werden konnte (4.3.4). Eine weitere Verkürzung des Cys-tags schien durchaus möglich, wobei die minimale Länge des Cys-tags aus nur zwei Aminosäuren, nämlich dem essentiellen Spleißnukleophil Serin und einem folgenden Cystein, besteht. Bestrebungen dahingehend, den Cys-tag des DnaB Inteins schrittweise zu verkleinern, scheiterten jedoch daran, dass die entsprechenden Konstrukte instabil waren und abgebaut wurden. Vergleicht man allerdings den Cys-tag mit anderen gebräuchlichen Fusionstags, wie z.B. der 25 kDa großen menschlichen Alkylguanintransferase (hAGT) oder dem kleineren Snap-tag Derivat (20 kDa), oder auch mit der aus ca. 80 Aminosäuren bestehenden PCP-Domäne für die Modifikation mit Phosphopantetheintransferasen so stellt der deutlich kleinere Cys-tag die wesentliche bessere Alternative dar. Anstelle der PCP-Domäne kann alternativ auch der 11 Aminosäuren große ybbR-tag [51] verwendet werden, dessen Größe mit dem hier beschriebenen Cys-tag durchaus vergleichbar ist.

Die Selektivität der Methode, die durch die spezifische Interaktion der beiden komplementären Inteinfragmente zustande kommt, konnte auch noch für eine weitere Anwendung ausgenutzt werden, nämlich die selektive Modifikation eines ungereinigten Proteins (in diesem Fall des Maltose-bindenden Proteins) in einem Zelllysats. Dieses wurde dafür als Fusionsprotein mit dem N-terminalen Intein in *E. coli* Zellen produziert. Nach dem Zellaufschluss wurde im Zelllysats, durch Zugabe des gereinigten und modifizierten Cys-tag Proteins, modifiziertes Spleißprodukt selektiv und in hohen Ausbeuten gebildet. Nebenreaktionen mit anderen Proteinen oder ein proteolytischer Abbau der Proteine wurden hierbei nicht beobachtet. Diese Anwendung stellt einen ganz wesentlichen Vorteil dieser Methode im Vergleich zu vielen traditionellen Biokonjugationsmethoden dar, bei denen in



analogen Reaktionen ein hohes Maß an unspezifischen Reaktionen zu erwarten ist. Die erfolgreiche Proteinmodifikation in einem Zelllysats ist auch ein wichtiger Schritt, um die Methode für *in vivo* Experimente anzuwenden.

Für den Einsatz einer jeweiligen Technik in lebenden Zellen ist neben der Toxizität der verwendeten Reagenzien auch immer die Bioverfügbarkeit der Reaktionspartner von Bedeutung. Wegen der Toxizität ist z.B. die Verwendung des FLaSH-tags oder die Click-Chemie wegen des benötigten Cu(I) problematisch. Allerdings ist nicht davon auszugehen, dass die hier beschriebenen Konstrukte in irgendeiner Form (cyto-)toxisch sind. Das andere wichtige Merkmal ist die Bioverfügbarkeit. Zum einen muss das Zielprotein mit dem entsprechenden Fusions-tag in ausreichender Menge in der Zelle produziert werden, zum anderen muss das Reagenz mit der detektierbaren Sonde in der Lage sein in die Zelle einzudringen und lokal mit dem Protein zu reagieren.

Einige der bereits beschriebenen Techniken zur Modifikation von Proteinen wurden bisher in lebenden Zellen, auf Zelloberflächen oder in Zelllysaten angewendet. So wurde beispielsweise der AviTag mit CFP und der Transmembrandomäne eines Wachstumsfaktors fusioniert. Nach erfolgter Transfektion in HeLa-Zellen und Zugabe von Biotinligase BirA, ATP und Biotin konnte die erfolgreiche Biotinylierung anschließend anhand von Fluorophor- und Quantum Dot-modifiziertem Streptavidin nachgewiesen werden [43]. Ein anderes Beispiel beschreibt die Visualisierung des menschlichen Membranproteins CD40L in HEK 293T Zellen durch einen C-terminalen Aldehyd-tag [53]. Auch mit hAGT konnten zahlreiche *in vivo* Experimente durchgeführt werden. Zum einen wurde hAGT mit einer Kernlokalisationssequenz fusioniert und der Zellkern anschließend durch Zugabe des zellpermeablen Benzylguanin-Diacetatfluorescein visualisiert. Auch das cytosolische Protein  $\beta$ -Galaktosidase und ein Membranprotein konnten auf diese Weise nach Zugabe des modifizierten Benzylguaninsubstrates beobachtet werden [56, 57]. Ebenso wurde auch die Sfp-katalysierte Modifikation für die Markierung von ACP-Fusionsproteinen an Zelloberflächen verwendet. Als Beispiel diente dafür eine ACP-Fusion mit dem Oberflächenprotein Sag1p der Hefe. Sag1p ist ein Agglutinin und kovalent mit der Zellwand über eine Glykosyl-Phosphatidylinositoleinheit verbunden. Durch Zugabe des entsprechenden CoA-Derivats und ACPS konnten nun Hefezellen, die das entsprechende Fusionsprotein produzierten, visualisiert werden [50]. Allerdings ist hierbei zu bemerken, dass diese Methode nicht generell für intrazelluläre Anwendungen geeignet ist, da die meisten CoA-Derivate nicht zellpermeabel sind. Andere *in vivo* Experimente konnten auch über die nicht-kovalente

Interaktion zwischen FKBP und dessen Substrate Methotrexat und Trimethoprim gemacht werden [60, 61, 164].

Auch Intein-vermittelte Reaktionen ließen sich bisher schon in lebenden Systemen anwenden. So konnte Gariat *et al.* zeigen, dass Proteinsemissynthese auch in CHO-Zellen stattfinden kann [165]. Hierfür wurde GFP mit der N-terminalen Hälfte des *Ssp* DnaE Inteins fusioniert und der C-terminale Teil des DnaE Inteins wurde zusammen mit einem kurzen FLAG-tag als C-Extein und einer Proteintransduktionsdomäne mittels Peptidfestphasensynthese hergestellt. Durch Zugabe des synthetischen Peptids zu transfizierten CHO-Zellen, die das entsprechende N-terminale Konstrukt exprimierten, konnte auf diese Weise Proteinspleißen beobachtet und das Spleißprodukt GFP-FLAG detektiert werden.

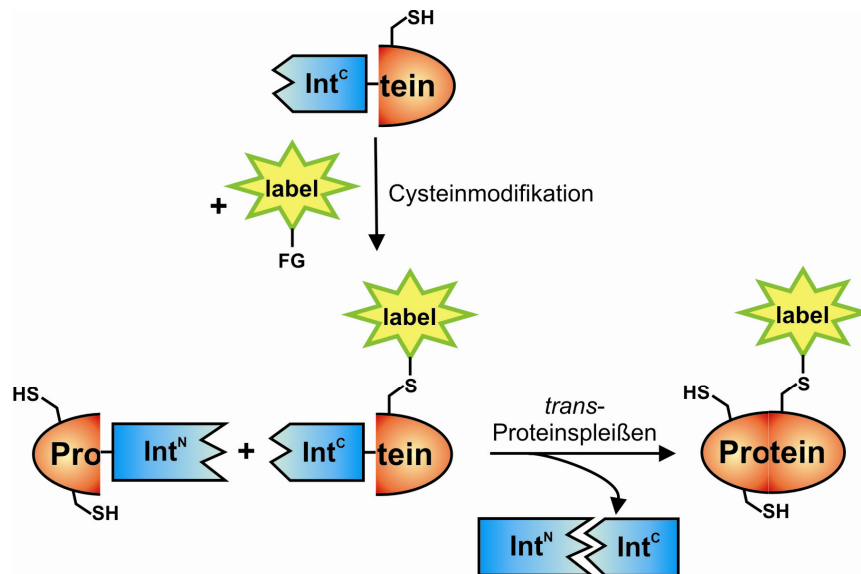
Auch für die Cys-tag Modifikationstechnik besteht das Hauptproblem in der Zellpermeabilität. Während man davon ausgehen kann, dass der N-terminale Teil nach erfolgter Transfektion in Säugetierzellen exprimiert wird, so besteht noch das Problem der Zellpermeabilität der C-terminalen Konstrukte inklusive modifiziertem Cys-tag. Dafür könnten vermutlich die Mikroinjektion oder eine Proteintransduktionsdomäne verwendet werden. Allerdings deuten die Untersuchungen zur selektiven Proteinmodifikation in einem *E. coli* Zelllysat darauf hin, dass die Reaktion spezifisch genug ist, um zumindest auch zur Modifikation von Proteinen in lysierten Säugetierzellen oder auf Zelloberflächen genutzt zu werden. Diesbezügliche Arbeiten, die das selektive Modifizieren eines beliebigen Zielproteins in lebenden Säugetierzellen erlauben, wurden in der Arbeitsgruppe bereits begonnen.

### 5.4.4 Flexibilität der Methode

Ein entscheidender Aspekt für das Anwendungspotential dieser Methode ist ihre Flexibilität. Die in dieser Arbeit dahingehend durchgeführten Untersuchungen belegen, dass die Methode nicht nur eine recht hohe Toleranz bezüglich der Zielproteine aufweist – so konnten sowohl das Maltose-bindende Protein, die  $\beta$ -Laktamase, das Thioredoxin, das menschliche Wachstumshormon hGH und die nicht-ribosomale Peptidsynthetase TycA erfolgreich modifiziert werden – sondern auch in Bezug auf die Thiol-reaktive Gruppe (Maleinimide und Iodacetamide) und insbesondere in Bezug auf die verwendeten biophysikalischen Sonden (diverse Fluorophore, Biotin, Polyethylenglykol). Des Weiteren konnten auch zwei verschiedene Inteine (das *Ssp* DnaB Intein und das *Mxe* GyrA Intein), sowie verschiedene Cys-tag-Sequenzen verwendet werden. Dabei ist allerdings zu bemerken, dass diese Methode keineswegs auf die hier beschriebenen Inteine beschränkt ist. Generell sind alle Inteine die

einen Cystein-freien C-Terminus besitzen, theoretisch dazu befähigt für die Cys-tag Modifikationsprozedur verwendet zu werden. Neben den weiteren natürlichen Kandidaten, wie dem künstlich gespaltenen *Psp* GB-D Pol Intein aus dem thermophilen Archaeobakterium *Pyrococcus sp.* GB-D und dem natürlich gespaltenen *Neq* Pol Intein können natürlich auch andere gespaltene Inteine verwendet werden, bei denen natürliche Cysteine ohne Funktionsverlust mutiert werden können (Inteine mit einem Cystein nukleophil natürlich ausgenommen). Auch ist diese Methode nicht auf das Funktionalisieren eines Cysteinrestes beschränkt. In alternativen Konstrukten könnten beispielsweise Inteine mit einem Lysin-freien C-terminalen Fragment zur Generierung eines Lys-tags genutzt werden. Eine Kombination aus beiden Methoden würde dann zu einer zweifachen Markierung des Zielproteins führen. Andere Techniken nutzen zu diesem Zweck orthogonale Paare. So konnten z.B. zwei orthogonale Biotinligase-Akzeptorpeptid-Paare zur Modifikation von HeLa-Zellen mit zwei unterschiedlichen Quantum Dots genutzt werden [45].

Ein weiterer Vorteil ergibt sich aus der Tatsache, dass die in dieser Arbeit beschriebene Technik nicht auf die C-terminale Modifikation von Proteinen beschränkt ist. Die Nutzung von entsprechenden Cystein-freien N-terminalen Inteinfragmenten könnte analog zur Generierung eines N-terminalen Cys-tags und damit auch zur selektiven N-terminalen Modifikation eines Zielproteins führen. In weiterführenden Überlegungen ist es auch durchaus vorstellbar, weder den N- noch den C-Terminus, sondern das Innere eines Zielproteins zu modifizieren. Dafür müsste statt einer artifiziellen Sequenz, wie in den hier gezeigten Beispielen, ein Teil eines Zielproteins als Cys-tag eingesetzt werden. Dementsprechend würde das Zielprotein in zwei Teile geteilt werden, wobei der N-terminale Teil als Fusion mit dem Int<sup>N</sup>-Fragment hergestellt wird und der C-terminale Teil mit dem zu modifizierenden Cystein als C-Extein mit dem komplementären Int<sup>C</sup>-Fragment fusioniert wird. Dieses Prinzip ist in Abb. 48 gezeigt.



**Abbildung 48: Modifikation von Cysteinen im Inneren eines Zielproteins.** Voraussetzung ist, dass der C-terminale Teil des Zielproteins nur ein Cystein trägt. Dieser Teil wird mit dem Cystein-freien C-terminalen Intein teil fusioniert, produziert, gereinigt und anschließend modifiziert. Durch *trans*-Proteinspleißen mit dem N-terminalen Teil des Zielproteins, das als Fusion mit dem komplementären Int<sup>N</sup>-Fragment hergestellt wurde, entsteht schließlich das intakte regioselektiv modifizierte Zielprotein.

Arbeiten, die diese Prozedur zur selektiven Modifikation von Cysteinen im Inneren eines Zielproteins ausnutzen, werden in der Arbeitsgruppe zur Zeit anhand der unspezifischen Pore OmpF aus *E. coli* durchgeführt. Dabei wird unter denaturierenden Bedingungen und unter Verwendung des gespaltenen *Psp* GB-D Pol Inteins ein Selektivitätsfilter in das Protein durch Cysteinmodifikation eingeführt und das modifizierte Protein anschließend zurückgefaltet und auf seine Aktivität als selektiver Ionenkanal untersucht [166].

#### 5.4.5 Ausbeute der Modifikationsreaktionen

Im vorherigen Abschnitt wurde im Wesentlichen auf die Methode im Ganzen, d.h. die Möglichkeit mit dieser Methode Proteine selektiv zu modifizieren, eingegangen und diese im Zusammenhang mit anderen entwickelten Techniken verglichen. In diesem Abschnitt soll nur auf einen Teilschritt dieser zweistufigen Prozedur, nämlich die Modifikationsreaktion, eingegangen werden. Neben der bereits beschriebenen Chemo- und Regioselektivität sind nämlich auch die Vollständigkeit der Modifikationsreaktion und/oder die Reinigung der modifizierten Proteine von Bedeutung. Im Laufe der Arbeit wurde auf unterschiedliche Weise versucht, die Ausbeute an modifizierten Cys-tag Protein zu bestimmen. Ganz generell eignen sich dazu am besten zwei unterschiedliche Methoden. Zum einen lassen sich freie Cysteine mit dem Ellman's Reagenz (5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure)) nachweisen. Dieses bildet mit Thiolen ein gemischtes Disulfid, wodurch das Chromophor 5-Mercapto-2-

Nitrobenzoesäure freigesetzt wird, welches durch Absorptionsmessungen verfolgt werden kann. Allerdings waren die eingesetzten Proteinkonzentrationen für diesen Test viel zu gering und lagen außerhalb der linearen Kalibrationskurven. Außerdem wurden die Messungen durch DTT gestört, welches für die Reduktion des Cysteins benötigt wurde und durch eine Gelfiltration vermutlich nicht vollständig entfernt werden konnte.

Bei einer anderen Methode wird die Effizienz des Einbaus eines Fluorophores in ein Protein photometrisch über Absorptionsmessungen bestimmt. Dabei wird das Verhältnis der Proteinabsorption bei einer Wellenlänge von 280 nm zu der Absorption bei der Wellenlänge, bei der das verwendete Fluorophor ein Maximum besitzt, bestimmt. Daraus lässt sich der molare Anteil an Fluorophor pro mol Protein berechnen. Aufgrund der geringen Konzentration der eingesetzten Proteine und durch die Tatsache, dass die Abtrennung des Fluorophors nicht immer quantitativ erfolgte, konnten zwar Werte von 50-80 % für die Modifikationseffizienz ermittelt werden, die aber sehr großen Schwankungen unterlagen.

Versuche unmodifiziertes Protein von modifiziertem Protein zu trennen, gelangen ausschließlich beim biotinylierten Protein mithilfe der monomeren Avidinmatrix. Fluorophormodifiziertes Protein konnte weder durch Anionenaustauscherchromatographie, noch durch HPLC von unmodifiziertem Protein getrennt werden. Interessanterweise konnte in einigen Fällen (z.B. für die Modifikation mit 5-IAF) nur modifiziertes Protein in massenspektrometrischen Analysen gefunden werden, was entweder daran gelegen haben könnte, dass kein unmodifiziertes Protein mehr vorlag, oder unmodifiziertes Protein aus einem anderen Grund in diesen Fällen nicht detektiert werden konnte. In anderen Fällen, z.B. bei der Reaktion mit Fluorescein-5-Maleinimid und bei der PEGylierung konnte anhand des SDS-PAGE Gels oder anhand der massenspektrometrischen Analyse noch unmodifiziertes Ausgangsmaterial identifiziert werden. Dabei stellte sich die Frage, warum die Reaktion in diesen Fällen nicht vollständig ablief. Ein Grund dafür könnte sein, dass ein Teil des Cys-tag Proteins so gefaltet war, dass das betreffende Cystein für die Modifikationsreagenzien nicht komplett frei zugänglich war. Auch besteht die Möglichkeit, dass die vorhandenen Cysteine eines Teils der Proteine irreversibel zur Sulfonsäure oxidiert worden sind. Andererseits könnten auch die eingesetzten Reagenzien mit der Zeit ihre Reaktivität verloren haben. Dabei muss natürlich berücksichtigt werden, dass sowohl Maleinimide, als auch Iodacetamide in Lösung Hydrolyse-empfindlich sind. Aus diesem Grund ist es durchaus möglich, dass je nach Reaktion ein nicht zu vernachlässigender Teil hydrolysiert und damit in einer inaktiven Form vorlag, obwohl die Lösungen immer frisch hergestellt wurden.

#### 5.4.6 Ausbeute der Spleißreaktionen

Analog zur Vollständigkeit der Modifikationsreaktion kann auch die Frage gestellt werden, warum die *trans*-Proteinspleißreaktion nicht quantitativ ablaufen konnte. Allerdings ist dieser Effekt durchaus nicht unüblich. Vielmehr wurde bisher in fast allen Experimenten mit künstlich gespaltenen Inteinen beobachtet, dass der Prozess des Proteinspleißens nicht vollständig abläuft. Dabei ist die Ausbeute an Spleißprodukt von Intein zu Intein sehr unterschiedlich und hängt zudem noch stark von der jeweiligen Exteinumgebung ab. Übliche Spleißausbeuten bewegen sich in einem Bereich von 0 bis nahezu 100 % (meistens zwischen 30-60 %), wobei zumeist SDS-PAGE oder Western Blot Analysen und *in vivo* Experimente für eine Quantifizierung herangezogen wurden. In der hier vorliegenden Arbeit wurde für das *Ssp* DnaB Intein mit MBP als N-Extein eine durchschnittliche Spleißausbeute von ca. 42 % nach zwei Stunden und bei 25°C ermittelt. Wurden andere Exteine verwendet (Trx, Bla) nahm die Spleißausbeute merklich ab, während bei komplexeren N-Exteinen (GFP, TycA) kaum noch Spleißproduktbildung beobachtet werden konnte, obwohl die ersten beiden Aminosäuren des N-Exteins (Position -1 & -2) dabei immer gleich waren und den natürlichen Exteinamino­säuren entsprachen. Durch die Verwendung des künstlich gespaltenen *Mxe* GyrA Inteins konnte die Ausbeute an Spleißprodukt um gut 50 % gesteigert werden. Diese lagen durchschnittlich bei 65 %, wobei auch durch die Verwendung der großen nicht-ribosomalen Peptidsynthetase als N-Extein keine geringeren Ausbeuten erhalten wurden. Allerdings verlief die Bildung des Spleißproduktes beim GyrA Intein langsamer, als beim DnaB Intein und zeigte außerdem geringen Mengen von bis zu 4 % des C-terminalen Hydrolyseproduktes. Das Auftreten des Hydrolyseproduktes bei Spleißreaktionen stellt jedoch nichts Ungewöhnliches dar. Vielmehr wurde für die meisten Inteine berichtet, dass neben dem Spleißprodukt auch größere Mengen an Hydrolyseprodukten (sowohl N- als auch C-terminal) entstehen. Dabei bleibt allerdings die Frage unbeantwortet, warum die beiden Ausgangsfusionsproteine des Inteins im Reaktionsverlauf nicht vollständig verbraucht werden. Die vielversprechendste Erklärung dafür ist, dass es bei der Assoziation der beiden Inteinfragmente, die beide zumindest partiell ungefaltet vorliegen, zur Missfaltung kommt und dadurch ein Teil des Intein­komplexes in einer inaktiven Form vorliegt. Dadurch sind der N- und C-Terminus des Inteins, die normalerweise sehr nahe beieinander vorliegen, ungünstig positioniert, so dass kein Proteinspleißen stattfinden kann. Andererseits könnten auch essentielle Cysteinseitenketten entweder inter- oder intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden. Diese Möglichkeit ist allerdings durch die Zugabe des Reduktionsmittel DTT im Spleißpuffer ziemlich gering. Andererseits können kleine Proteinmengen mit Cysteinen vorliegen, die

irreversibel zur Sulfonsäure oxidiert wurden. Alternativ konnte in anderen Arbeiten gezeigt werden, dass die Spleißreaktion durch zweiwertige Kationen, wie z.B.  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen inhibiert wird [167, 168]. Diese Inhibierung ist zwar reversibel und kann in der Regel durch die Zugabe von Chelatbildnern wieder aufgehoben werden. Durch geringe Mengen an Zinkionen aus dem Expressionsmedium, oder Nickelionen durch die Affinitätschromatographie könnte dann die Spleißreaktion inhibiert worden sein, obwohl in allen Spleißreaktionen EDTA zur Komplexierung dieser zweiwertiger Kationen vorhanden war. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Inteine in der Natur im Kontext der jeweiligen Exteinssequenz evolviert wurden. Aus diesem Grund wurde das Zusammenspiel der einzelnen Aminosäuren innerhalb des Inteins aber auch zwischen Aminosäuren des Inteins und des Exteins dahingehend optimiert. Löst man nun einen Teil aus diesem natürlichen Kontext heraus oder wird dieses Zusammenspiel in irgendeiner Weise beeinträchtigt, kommt es unweigerlich zu einer schlechteren Prozessierung und damit auch zumeist zu einer schlechteren Effizienz der Reaktion. Da in den hier gezeigten Beispielen die natürlichen Exteinamino-säuren der Inteine und zugleich auch die Struktur des Inteins durch Spaltung bzw. Spaltung und Entfernung einer Endonukleasedomäne verändert wurden, ist das Auftreten von fehlgefalteten Inteinfragmenten die wahrscheinlichste Erklärung für die reduzierte Spleißaktivität.

## 5.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte eine neue Methode entwickelt werden, mit der verschiedene Cystein-reiche Proteinen chemo- und regioselektiv modifiziert werden konnten. Sowohl die Proteine  $\beta$ -Laktamase, Thioredoxin und die nicht-ribosomale Peptidsynthetase TycA konnten selektiv am C-Terminus modifiziert werden und deren Aktivität anschließend enzymatisch nachgewiesen werden. Ausgehend von diesen Proteinen könnte mit derselben Methode wie in Abb. 48 gezeigt, ein Protein gespalten und der C-terminale Teil davon als Cys-tag modifiziert werden, um anschließend intaktes modifiziertes Protein durch Proteinspleißen zu generieren.

Als ergänzende Anwendung würde sich in diesem Zusammenhang besonders gut die weitere Charakterisierung der bereits verwendeten Peptidsynthetase TycA eignen. In verschiedenen Experimenten könnte man auf diese Weise Einblicke in die Interaktion zweier aufeinander folgender Module, sowie in die Subdomänenbewegung innerhalb eines Moduls erhalten. Zu diesem Zweck könnten vor allem FRET-Messungen durchgeführt werden, wofür allerdings die regioselektive Positionierung zweier unterschiedlicher Fluorophore vonnöten

ist. Beispielsweise könnte ein Fluorophor entweder durch direkte Modifikation eines Cysteinrestes des Proteins, oder als CoA-Derivat durch die Sfp vermittelte Modifikation auf die PCP-Domäne übertragen werden. Das zweite Fluorophor des FRET-Paares könnte dann, durch die in dieser Arbeit beschriebenen Methode der Cys-tag Modifikation, am C-Terminus eingeführt werden. Durch FRET-Messungen könnte dann die Position der PCP-Domäne relativ zum C-Terminus in Gegenwart und in Abwesenheit von Substrataminosäuren oder bestimmten Inhibitoren untersucht werden. Eine ähnliche Versuchsanordnung wird auch benötigt, um die Affinität zweier benachbarter NRPS-Module zu untersuchen. Dazu müsste in beide Module jeweils ein Fluorophor selektiv eingebracht werden, was durch die N- oder C-terminale oder Sfp-katalysierte Modifikation des jeweiligen Proteins erreicht werden könnte. Durch weitere mögliche Untersuchungen könnten auch Motive, die für die spezifische Erkennung zweier aufeinander folgender Module benötigt werden identifiziert werden. In der Literatur wurde berichtet, dass kleine, zwischen 15 und 30 Aminosäuren lange Kommunikation-vermittelnde Domänen (COM-domain, engl. communication-mediating domains) für diese spezifische Erkennung benachbarter NRPS-Module verantwortlich sind [169]. Die hier beschriebene Cys-tag Technologie könnte ein weiteres Hilfsmittel zur Identifizierung spezifischer Aminosäuren in diesen Kommunikationsdomänen sein, die für die intermolekulare Modulerkennung verantwortlich sind. Ein diesbezügliches Experiment könnte z.B. wie folgt aussehen: die C-terminale Kommunikationsdomäne eines NRPS-Moduls würde mit einem einzigen natürlichen oder mutierten Cystein als C-Extreinsequenz eines gespaltenen Inteins fusioniert werden und das gesamte restliche Protein als N-terminale Fusion eines N-terminalen Inteinfragmentes. In einem ersten Schritt könnte dann das C-terminale Konstrukt in der COM-Domäne mit einem Maleinimid-funktionalisierten Cross-Linker selektiv modifiziert werden. Durch Proteinspleißen wird so ein komplettes regioselektiv mit einem Cross-linker modifiziertes NRPS-Modul generiert. Durch Zugabe des entsprechenden benachbarten Moduls und durch das Auslösen der Cross-linking Reaktion, wird eine kovalente Bindung zwischen den beiden Modulen gebildet werden. Da diese Reagenzien nur über kurze Distanzen reagieren, werden nur Aminosäurenreste aus den beiden Modulen verbunden, die in räumlicher Nähe zueinander liegen. Dadurch könnten genaue Informationen über die Art dieser Modulinteraktionen erhalten werden.

Zur weiteren Charakterisierung des neuen künstlich gespaltenen GyrA Inteins könnte außerdem die Assoziations-, bzw. Dissoziationskonstante über Fluoreszenzanisotropie- oder FRET-Messungen bestimmt werden.



Außerdem sollte die Orthogonalität der beidern Inteinsysteme in einer Tandem-Proteinspleißreaktion ausgenutzt werden können. Dabei würde ein N-terminaler Teil eines Proteins mit dem Teil eines ersten Inteins  $\text{Int1}^{\text{N}}$ , ein internes Proteinteil würde am N-Terminus mit dem komplementären  $\text{Int1}^{\text{C}}$  und am C-Terminus mit dem N-terminalen Fragment des orthogonalen Inteins  $\text{Int2}^{\text{N}}$  ausgestattet werden. Zuletzt könnte ein drittes C-terminales Proteinteil mit dem komplementären C-terminalen Teil des zweiten Inteins ( $\text{Int2}^{\text{C}}$ ) fusioniert werden. Ein Tandem Spleißsystem wurde bereits von Shi *et al.*, bestehend aus dem *Ssp* DnaE Intein und dem *Sce* VMA Intein, entwickelt [98]. Dabei wurde eine SH2-Domäne mit  $\text{DnaE}^{\text{N}}$ , die N-terminale SH3-Domäne mit dem  $\text{DnaE}^{\text{C}}$  und  $\text{VMA}^{\text{N}}$ -FKBP und die C-terminale SH3-Domäne mit FRB- $\text{VMA}^{\text{C}}$  fusioniert. Als Spleißprodukt entstand dabei das Konstrukt  $\text{SH2-SH3}^{\text{N-SH3}^{\text{C}}}$ , was mittels eines N-terminalen FLAG-tag und eines C-terminalen His<sub>6</sub>-tag verfolgt werden konnte.

## 6 Literatur

1. Hahn, M.E. and T.W. Muir, *Manipulating proteins with chemistry: a cross-section of chemical biology*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(1): p. 26-34.
2. Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*. 1996.
3. Prescher, J.A. and C.R. Bertozzi, *Chemistry in living systems*. Nat Chem Biol, 2005. **1**(1): p. 13-21.
4. Zimmer, M., *Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior*. Chem Rev, 2002. **102**(3): p. 759-81.
5. Zhang, J., et al., *Creating new fluorescent probes for cell biology*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(12): p. 906-18.
6. Selvin, P.R., *The renaissance of fluorescence resonance energy transfer*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(9): p. 730-4.
7. Wang, L., J. Xie, and P.G. Schultz, *Expanding the genetic code*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2006. **35**: p. 225-49.
8. Xie, J. and P.G. Schultz, *A chemical toolkit for proteins--an expanded genetic code*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(10): p. 775-82.
9. Dawson, P.E. and S.B. Kent, *Synthesis of native proteins by chemical ligation*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 923-60.
10. Muir, T.W., *Semisynthesis of proteins by expressed protein ligation*. Annu Rev Biochem, 2003. **72**: p. 249-89.
11. Haugland, R., *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, ed. R. Haugland. 2002.
12. Francis, M.B., *New Methods for Protein Bioconjugation*, in *Chemical Biology - From Small Molecules to Systems Biology and Drug Design*, S.L. Schreiber, Kapoor, T., Wess, G., Editor. 2007, Wiley-VCH: Weinheim. p. 593-634.
13. Geoghegan, K.F. and J.G. Stroh, *Site-directed conjugation of nonpeptide groups to peptides and proteins via periodate oxidation of a 2-amino alcohol. Application to modification at N-terminal serine*. Bioconjug Chem, 1992. **3**(2): p. 138-46.
14. Higgins, H.G. and K.J. Harrington, *Reaction of amino acids and proteins with diazonium compounds. II. Spectra of protein derivatives*. Arch Biochem Biophys, 1959. **85**: p. 409-25.
15. Schlick, T.L., et al., *Dual-surface modification of the tobacco mosaic virus*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(11): p. 3718-23.
16. Romanini, D.W. and M.B. Francis, *Attachment of peptide building blocks to proteins through tyrosine bioconjugation*. Bioconjug Chem, 2008. **19**(1): p. 153-7.
17. Tilley, S.D. and M.B. Francis, *Tyrosine-selective protein alkylation using pi-allylpalladium complexes*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(4): p. 1080-1.
18. Antos, J.M. and M.B. Francis, *Transition metal catalyzed methods for site-selective protein modification*. Curr Opin Chem Biol, 2006. **10**(3): p. 253-62.
19. Antos, J.M. and M.B. Francis, *Selective tryptophan modification with rhodium carbenoids in aqueous solution*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(33): p. 10256-7.
20. Agard, N.J., et al., *A comparative study of bioorthogonal reactions with azides*. ACS Chem Biol, 2006. **1**(10): p. 644-8.
21. Baskin, J.M., et al., *Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(43): p. 16793-7.
22. Saxon, E. and C.R. Bertozzi, *Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction*. Science, 2000. **287**(5460): p. 2007-10.

23. Agard, N.J., J.A. Prescher, and C.R. Bertozzi, *A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(46): p. 15046-7.
24. Kiick, K.L., et al., *Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): p. 19-24.
25. Link, A.J., M.L. Mock, and D.A. Tirrell, *Non-canonical amino acids in protein engineering*. Curr Opin Biotechnol, 2003. **14**(6): p. 603-9.
26. Datta, D., et al., *A designed phenylalanyl-tRNA synthetase variant allows efficient in vivo incorporation of aryl ketone functionality into proteins*. J Am Chem Soc, 2002. **124**(20): p. 5652-3.
27. Kirshenbaum, K., I.S. Carrico, and D.A. Tirrell, *Biosynthesis of proteins incorporating a versatile set of phenylalanine analogues*. Chembiochem, 2002. **3**(2-3): p. 235-7.
28. Link, A.J., M.K. Vink, and D.A. Tirrell, *Synthesis of the functionalizable methionine surrogate azidohomoalanine using Boc-homoserine as precursor*. Nat Protoc, 2007. **2**(8): p. 1884-7.
29. Deiters, A., et al., *Adding amino acids with novel reactivity to the genetic code of Saccharomyces cerevisiae*. J Am Chem Soc, 2003. **125**(39): p. 11782-3.
30. Deiters, A. and P.G. Schultz, *In vivo incorporation of an alkyne into proteins in Escherichia coli*. Bioorg Med Chem Lett, 2005. **15**(5): p. 1521-4.
31. Chin, J.W., et al., *An expanded eukaryotic genetic code*. Science, 2003. **301**(5635): p. 964-7.
32. Zhang, Z., et al., *A new strategy for the site-specific modification of proteins in vivo*. Biochemistry, 2003. **42**(22): p. 6735-46.
33. Adams, S.R., et al., *New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: synthesis and biological applications*. J Am Chem Soc, 2002. **124**(21): p. 6063-76.
34. Griffin, B.A., et al., *Fluorescent labeling of recombinant proteins in living cells with FLAsH*. Methods Enzymol, 2000. **327**: p. 565-78.
35. Griffin, B.A., S.R. Adams, and R.Y. Tsien, *Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells*. Science, 1998. **281**(5374): p. 269-72.
36. Waibel, R., et al., *Stable one-step technetium-99m labeling of His-tagged recombinant proteins with a novel Tc(I)-carbonyl complex*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(9): p. 897-901.
37. Wang, Y., X. Liu, and D.J. Hnatowich, *An improved synthesis of NHS-MAG3 for conjugation and radiolabeling of biomolecules with (99m)Tc at room temperature*. Nat Protoc, 2007. **2**(4): p. 972-8.
38. Wang, Y., G. Liu, and D.J. Hnatowich, *Methods for MAG3 conjugation and 99mTc radiolabeling of biomolecules*. Nat Protoc, 2006. **1**(3): p. 1477-80.
39. George, A.J., et al., *Radiometal labeling of recombinant proteins by a genetically engineered minimal chelation site: technetium-99m coordination by single-chain Fv antibody fusion proteins through a C-terminal cysteinyl peptide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(18): p. 8358-62.
40. Cull, M.G. and P.J. Schatz, *Biotinylation of proteins in vivo and in vitro using small peptide tags*. Methods Enzymol, 2000. **326**: p. 430-40.
41. Chapman-Smith, A., et al., *Molecular recognition in a post-translational modification of exceptional specificity. Mutants of the biotinylated domain of acetyl-CoA carboxylase defective in recognition by biotin protein ligase*. J Biol Chem, 1999. **274**(3): p. 1449-57.

42. Cull, M.G., J.F. Miller, and P.J. Schatz, *Screening for receptor ligands using large libraries of peptides linked to the C terminus of the lac repressor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(5): p. 1865-9.
43. Howarth, M., et al., *Targeting quantum dots to surface proteins in living cells with biotin ligase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(21): p. 7583-8.
44. Chen, I., et al., *Site-specific labeling of cell surface proteins with biophysical probes using biotin ligase*. Nat Methods, 2005. **2**(2): p. 99-104.
45. Chen, I., Y.A. Choi, and A.Y. Ting, *Phage display evolution of a peptide substrate for yeast biotin ligase and application to two-color quantum dot labeling of cell surface proteins*. J Am Chem Soc, 2007. **129**(20): p. 6619-25.
46. Mofid, M.R., et al., *Structure-based mutational analysis of the 4'-phosphopantetheinyl transferases Sfp from Bacillus subtilis: carrier protein recognition and reaction mechanism*. Biochemistry, 2004. **43**(14): p. 4128-36.
47. Mofid, M.R., R. Finking, and M.A. Marahiel, *Recognition of hybrid peptidyl carrier proteins/acyl carrier proteins in nonribosomal peptide synthetase modules by the 4'-phosphopantetheinyl transferases AcpS and Sfp*. J Biol Chem, 2002. **277**(19): p. 17023-31.
48. Yin, J., et al., *Site-specific protein labeling by Sfp phosphopantetheinyl transferase*. Nat Protoc, 2006. **1**(1): p. 280-5.
49. Zhou, Z., et al., *Genetically encoded short peptide tags for orthogonal protein labeling by Sfp and AcpS phosphopantetheinyl transferases*. ACS Chem Biol, 2007. **2**(5): p. 337-46.
50. Vivero-Pol, L., et al., *Multicolor imaging of cell surface proteins*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(37): p. 12770-1.
51. Yin, J., et al., *Genetically encoded short peptide tag for versatile protein labeling by Sfp phosphopantetheinyl transferase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(44): p. 15815-20.
52. Schmidt, B., et al., *A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency*. Cell, 1995. **82**(2): p. 271-8.
53. Carrico, I.S., B.L. Carlson, and C.R. Bertozzi, *Introducing genetically encoded aldehydes into proteins*. Nat Chem Biol, 2007. **3**(6): p. 321-2.
54. Keppler, A., et al., *A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(1): p. 86-9.
55. Gronemeyer, T., et al., *Directed evolution of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase for applications in protein labeling*. Protein Eng Des Sel, 2006. **19**(7): p. 309-16.
56. Juillerat, A., et al., *Directed evolution of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase for efficient labeling of fusion proteins with small molecules in vivo*. Chem Biol, 2003. **10**(4): p. 313-7.
57. Juillerat, A., et al., *Engineering substrate specificity of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase for specific protein labeling in living cells*. Chembiochem, 2005. **6**(7): p. 1263-9.
58. Mao, H., et al., *Sortase-mediated protein ligation: a new method for protein engineering*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(9): p. 2670-1.
59. Popp, M.W., et al., *Sortagging: a versatile method for protein labeling*. Nat Chem Biol, 2007. **3**(11): p. 707-8.
60. Miller, L.W., et al., *Methotrexate conjugates: a molecular in vivo protein tag*. Angew Chem Int Ed Engl, 2004. **43**(13): p. 1672-5.
61. Calloway, N.T., et al., *Optimized fluorescent trimethoprim derivatives for in vivo protein labeling*. Chembiochem, 2007. **8**(7): p. 767-74.
62. Miller, L.W., et al., *In vivo protein labeling with trimethoprim conjugates: a flexible chemical tag*. Nat Methods, 2005. **2**(4): p. 255-7.

63. Marks, K.M., P.D. Braun, and G.P. Nolan, *A general approach for chemical labeling and rapid, spatially controlled protein inactivation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(27): p. 9982-7.
64. Clackson, T., et al., *Redesigning an FKBP-ligand interface to generate chemical dimerizers with novel specificity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(18): p. 10437-42.
65. Kho, Y., et al., *A tagging-via-substrate technology for detection and proteomics of farnesylated proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(34): p. 12479-84.
66. Duckworth, B.P., et al., *Selective labeling of proteins by using protein farnesyltransferase*. Chembiochem, 2007. **8**(1): p. 98-105.
67. Ojida, A., et al., *Oligo-Asp tag/Zn(II) complex probe as a new pair for labeling and fluorescence imaging of proteins*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(32): p. 10452-9.
68. Nonaka, H., et al., *Non-enzymatic covalent protein labeling using a reactive tag*. J Am Chem Soc, 2007. **129**(51): p. 15777-9.
69. Lin, C.W. and A.Y. Ting, *Transglutaminase-catalyzed site-specific conjugation of small-molecule probes to proteins in vitro and on the surface of living cells*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(14): p. 4542-3.
70. Sato, H., et al., *Site-specific modification of interleukin-2 by the combined use of genetic engineering techniques and transglutaminase*. Biochemistry, 1996. **35**(40): p. 13072-80.
71. Los, G.V. and K. Wood, *The HaloTag: a novel technology for cell imaging and protein analysis*. Methods Mol Biol, 2007. **356**: p. 195-208.
72. Liu, X.Q., *Protein-splicing intein: Genetic mobility, origin, and evolution*. Annu Rev Genet, 2000. **34**: p. 61-76.
73. Pietrokovski, S., *Conserved sequence features of inteins (protein introns) and their use in identifying new inteins and related proteins*. Protein Sci, 1994. **3**(12): p. 2340-50.
74. Perler, F.B., *InBase: the Intein Database*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(1): p. 383-4.
75. Gogarten, J.P., et al., *Inteins: structure, function, and evolution*. Annu Rev Microbiol, 2002. **56**: p. 263-87.
76. Cooper, A.A. and T.H. Stevens, *Protein splicing: self-splicing of genetically mobile elements at the protein level*. Trends Biochem Sci, 1995. **20**(9): p. 351-6.
77. Xu, M.Q. and F.B. Perler, *The mechanism of protein splicing and its modulation by mutation*. Embo J, 1996. **15**(19): p. 5146-53.
78. Xu, M.Q., et al., *In vitro protein splicing of purified precursor and the identification of a branched intermediate*. Cell, 1993. **75**(7): p. 1371-7.
79. Xu, M.Q., et al., *Protein splicing: an analysis of the branched intermediate and its resolution by succinimide formation*. Embo J, 1994. **13**(23): p. 5517-22.
80. Shao, Y., M.Q. Xu, and H. Paulus, *Protein splicing: evidence for an N-O acyl rearrangement as the initial step in the splicing process*. Biochemistry, 1996. **35**(12): p. 3810-5.
81. Shao, Y. and H. Paulus, *Protein splicing: estimation of the rate of O-N and S-N acyl rearrangements, the last step of the splicing process*. J Pept Res, 1997. **50**(3): p. 193-8.
82. Southworth, M.W., et al., *Control of protein splicing by intein fragment reassembly*. Embo J, 1998. **17**(4): p. 918-26.
83. Noren, C.J., J. Wang, and F.B. Perler, *Dissecting the Chemistry of Protein Splicing and Its Applications*. Angew Chem Int Ed Engl, 2000. **39**(3): p. 450-466.
84. Chong, S., et al., *Protein splicing involving the Saccharomyces cerevisiae VMA intein. The steps in the splicing pathway, side reactions leading to protein cleavage, and establishment of an in vitro splicing system*. J Biol Chem, 1996. **271**(36): p. 22159-68.

85. Komori, K., et al., *PI-PfuI and PI-PfuII, intein-coded homing endonucleases from Pyrococcus furiosus. I. Purification and identification of the homing-type endonuclease activities*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(21): p. 4167-74.
86. Komori, K., et al., *PI-PfuI and PI-PfuII, intein-coded homing endonucleases from Pyrococcus furiosus. II. Characterization Of the binding and cleavage abilities by site-directed mutagenesis*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(21): p. 4175-82.
87. Wu, H., M.Q. Xu, and X.Q. Liu, *Protein trans-splicing and functional mini-inteins of a cyanobacterial dnaB intein*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1387**(1-2): p. 422-32.
88. Telenti, A., et al., *The Mycobacterium xenopi GyrA protein splicing element: characterization of a minimal intein*. J Bacteriol, 1997. **179**(20): p. 6378-82.
89. Evans, T.C., Jr., J. Benner, and M.Q. Xu, *The in vitro ligation of bacterially expressed proteins using an intein from Methanobacterium thermoautotrophicum*. J Biol Chem, 1999. **274**(7): p. 3923-6.
90. Southworth, M.W., J. Benner, and F.B. Perler, *An alternative protein splicing mechanism for inteins lacking an N-terminal nucleophile*. Embo J, 2000. **19**(18): p. 5019-26.
91. Butler, M.I. and R.T. Poulter, *The PRP8 inteins in Cryptococcus are a source of phylogenetic and epidemiological information*. Fungal Genet Biol, 2005. **42**(5): p. 452-63.
92. Elleuche, S., N. Nolting, and S. Poggeler, *Protein splicing of PRP8 mini-inteins from species of the genus Penicillium*. Appl Microbiol Biotechnol, 2006. **72**(5): p. 959-67.
93. Ding, Y., et al., *Crystal structure of a mini-intein reveals a conserved catalytic module involved in side chain cyclization of asparagine during protein splicing*. J Biol Chem, 2003. **278**(40): p. 39133-42.
94. Klabunde, T., et al., *Crystal structure of GyrA intein from Mycobacterium xenopi reveals structural basis of protein splicing*. Nat Struct Biol, 1998. **5**(1): p. 31-6.
95. Martin, D.D., M.Q. Xu, and T.C. Evans, Jr., *Characterization of a naturally occurring trans-splicing intein from Synechocystis sp. PCC6803*. Biochemistry, 2001. **40**(5): p. 1393-402.
96. Nichols, N.M. and T.C. Evans, Jr., *Mutational analysis of protein splicing, cleavage, and self-association reactions mediated by the naturally split Ssp DnaE intein*. Biochemistry, 2004. **43**(31): p. 10265-76.
97. Nichols, N.M., et al., *Zinc ion effects on individual Ssp DnaE intein splicing steps: regulating pathway progression*. Biochemistry, 2003. **42**(18): p. 5301-11.
98. Shi, J. and T.W. Muir, *Development of a tandem protein trans-splicing system based on native and engineered split inteins*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(17): p. 6198-206.
99. Wu, H., Z. Hu, and X.Q. Liu, *Protein trans-splicing by a split intein encoded in a split DnaE gene of Synechocystis sp. PCC6803*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9226-31.
100. Evans, T.C., Jr., et al., *Protein trans-splicing and cyclization by a naturally split intein from the dnaE gene of Synechocystis species PCC6803*. J Biol Chem, 2000. **275**(13): p. 9091-4.
101. Iwai, H., et al., *Highly efficient protein trans-splicing by a naturally split DnaE intein from Nostoc punctiforme*. FEBS Lett, 2006. **580**(7): p. 1853-8.
102. Wei, X.Y., et al., *Expression of split dnaE genes and trans-splicing of DnaE intein in the developmental cyanobacterium Anabaena sp. PCC 7120*. Res Microbiol, 2006. **157**(3): p. 227-34.
103. Choi, J.J., et al., *Protein trans-splicing and characterization of a split family B-type DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeal parasite Nanoarchaeum equitans*. J Mol Biol, 2006. **356**(5): p. 1093-106.

104. Shingledecker, K., S.Q. Jiang, and H. Paulus, *Molecular dissection of the Mycobacterium tuberculosis RecA intein: design of a minimal intein and of a trans-splicing system involving two intein fragments*. Gene, 1998. **207**(2): p. 187-95.
105. Mills, K.V., et al., *Protein splicing in trans by purified N- and C-terminal fragments of the Mycobacterium tuberculosis RecA intein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(7): p. 3543-8.
106. Chong, S. and M.Q. Xu, *Protein splicing of the Saccharomyces cerevisiae VMA intein without the endonuclease motifs*. J Biol Chem, 1997. **272**(25): p. 15587-90.
107. Ozawa, T., et al., *A fluorescent indicator for detecting protein-protein interactions in vivo based on protein splicing*. Anal Chem, 2000. **72**(21): p. 5151-7.
108. Sun, W., J. Yang, and X.Q. Liu, *Synthetic two-piece and three-piece split inteins for protein trans-splicing*. J Biol Chem, 2004. **279**(34): p. 35281-6.
109. Ludwig, C., et al., *Ligation of a synthetic peptide to the N terminus of a recombinant protein using semisynthetic protein trans-splicing*. Angew Chem Int Ed Engl, 2006. **45**(31): p. 5218-21.
110. Dawson, P.E., et al., *Synthesis of proteins by native chemical ligation*. Science, 1994. **266**(5186): p. 776-9.
111. Arnold, U., et al., *Protein prosthesis: a nonnatural residue accelerates folding and increases stability*. J Am Chem Soc, 2003. **125**(25): p. 7500-1.
112. Romanelli, A., et al., *Semisynthesis of a segmental isotopically labeled protein splicing precursor: NMR evidence for an unusual peptide bond at the N-extein-intein junction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(17): p. 6397-402.
113. Macmillan, D. and C.R. Bertozzi, *Modular assembly of glycoproteins: towards the synthesis of GlyCAM-1 by using expressed protein ligation*. Angew Chem Int Ed Engl, 2004. **43**(11): p. 1355-9.
114. Muralidharan, V. and T.W. Muir, *Protein ligation: an enabling technology for the biophysical analysis of proteins*. Nat Methods, 2006. **3**(6): p. 429-38.
115. Evans, T.C., Jr., J. Benner, and M.Q. Xu, *The cyclization and polymerization of bacterially expressed proteins using modified self-splicing inteins*. J Biol Chem, 1999. **274**(26): p. 18359-63.
116. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
117. Vogelstein, B. and D. Gillespie, *Preparative and analytical purification of DNA from agarose*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(2): p. 615-9.
118. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory manual*. 1989, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
119. Mootz, H.D., et al., *Conditional protein splicing: a new tool to control protein structure and function in vitro and in vivo*. J Am Chem Soc, 2003. **125**(35): p. 10561-9.
120. Brenzel, S., T. Kurpiers, and H.D. Mootz, *Engineering artificially split inteins for applications in protein chemistry: biochemical characterization of the split Ssp DnaB intein and comparison to the split Sce VMA intein*. Biochemistry, 2006. **45**(6): p. 1571-8.
121. Rivera, V.M., et al., *Regulation of protein secretion through controlled aggregation in the endoplasmic reticulum*. Science, 2000. **287**(5454): p. 826-30.
122. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
123. Bennett, J. and K.J. Scott, *Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue*. Anal Biochem, 1971. **43**(1): p. 173-82.

124. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
125. Porath, J., et al., *Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation*. Nature, 1975. **258**(5536): p. 598-9.
126. Schmidt, T.G. and A. Skerra, *The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins*. Nat Protoc, 2007. **2**(6): p. 1528-35.
127. Gill, S.C. and P.H. von Hippel, *Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data*. Anal Biochem, 1989. **182**(2): p. 319-26.
128. O'Callaghan, C.H., et al., *Novel method for detection of beta-lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate*. Antimicrob Agents Chemother, 1972. **1**(4): p. 283-8.
129. Holmgren, A., *Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide*. J Biol Chem, 1979. **254**(19): p. 9627-32.
130. Stachelhaus, T., et al., *Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain*. J Biol Chem, 1998. **273**(35): p. 22773-81.
131. Linne, U., et al., *Systematic and quantitative analysis of protein-protein recognition between nonribosomal peptide synthetases investigated in the tyrocidine biosynthetic template*. Biochemistry, 2003. **42**(17): p. 5114-24.
132. Jelsch, C., et al., *Crystal structure of Escherichia coli TEM1 beta-lactamase at 1.8 Å resolution*. Proteins, 1993. **16**(4): p. 364-83.
133. Katti, S.K., D.M. LeMaster, and H. Eklund, *Crystal structure of thioredoxin from Escherichia coli at 1.68 Å resolution*. J Mol Biol, 1990. **212**(1): p. 167-84.
134. Holmgren, A., *Thioredoxin*. Annu Rev Biochem, 1985. **54**: p. 237-71.
135. Fitzsimons Hall, M., et al., *Creation of an artificial bifunctional intein by grafting a homing endonuclease into a mini-intein*. J Mol Biol, 2002. **323**(2): p. 173-9.
136. Evans, T.C., Jr., J. Benner, and M.Q. Xu, *Semisynthesis of cytotoxic proteins using a modified protein splicing element*. Protein Sci, 1998. **7**(11): p. 2256-64.
137. Evans, T.C., Jr. and M.Q. Xu, *Intein-mediated protein ligation: harnessing nature's escape artists*. Biopolymers, 1999. **51**(5): p. 333-42.
138. Valiyaveetil, F.I., R. MacKinnon, and T.W. Muir, *Semisynthesis and folding of the potassium channel KcsA*. J Am Chem Soc, 2002. **124**(31): p. 9113-20.
139. Valiyaveetil, F.I., et al., *Semisynthesis of a functional K<sup>+</sup> channel*. Angew Chem Int Ed Engl, 2004. **43**(19): p. 2504-7.
140. Harris, J.M. and R.B. Chess, *Effect of pegylation on pharmaceuticals*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(3): p. 214-21.
141. Zimmerman, S.B. and L.D. Murphy, *Electrophoresis of polyethylene glycols and related materials as sodium dodecyl sulfate complexes*. Anal Biochem, 1996. **234**(2): p. 190-3.
142. Odom, O.W., et al., *An effect of polyethylene glycol 8000 on protein mobility in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and a method for eliminating this effect*. Anal Biochem, 1997. **245**(2): p. 249-52.
143. de Vos, A.M., M. Ultsch, and A.A. Kossiakoff, *Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex*. Science, 1992. **255**(5042): p. 306-12.
144. Konz, D. and M.A. Marahiel, *How do peptide synthetases generate structural diversity?* Chem Biol, 1999. **6**(2): p. R39-48.
145. Schwarzer, D. and M.A. Marahiel, *Multimodular biocatalysts for natural product assembly*. Naturwissenschaften, 2001. **88**(3): p. 93-101.
146. Schwarzer, D., R. Finking, and M.A. Marahiel, *Nonribosomal peptides: from genes to products*. Nat Prod Rep, 2003. **20**(3): p. 275-87.



147. Mootz, H.D., D. Schwarzer, and M.A. Marahiel, *Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases*. *Chembiochem*, 2002. **3**(6): p. 490-504.
148. Grunewald, J. and M.A. Marahiel, *Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2006. **70**(1): p. 121-46.
149. Marahiel, M.A., T. Stachelhaus, and H.D. Mootz, *Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis*. *Chem Rev*, 1997. **97**(7): p. 2651-2674.
150. Mootz, H.D., R. Finking, and M.A. Marahiel, *4'-phosphopantetheine transfer in primary and secondary metabolism of Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(40): p. 37289-98.
151. Mootz, H.D. and M.A. Marahiel, *The tyrocidine biosynthesis operon of Bacillus brevis: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains*. *J Bacteriol*, 1997. **179**(21): p. 6843-50.
152. Mootz, H.D., D. Schwarzer, and M.A. Marahiel, *Construction of hybrid peptide synthetases by module and domain fusions*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(11): p. 5848-53.
153. Gruenewald, S., et al., *In vivo production of artificial nonribosomal peptide products in the heterologous host Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2004. **70**(6): p. 3282-91.
154. Lew, B.M., K.V. Mills, and H. Paulus, *Protein splicing in vitro with a semisynthetic two-component minimal intein*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(26): p. 15887-90.
155. Mootz, H.D., E.S. Blum, and T.W. Muir, *Activation of an autoregulated protein kinase by conditional protein splicing*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2004. **43**(39): p. 5189-92.
156. Chong, S., et al., *Modulation of protein splicing of the Saccharomyces cerevisiae vacuolar membrane ATPase intein*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(17): p. 10567-77.
157. Davis, E.O., et al., *Protein splicing in the maturation of M. tuberculosis recA protein: a mechanism for tolerating a novel class of intervening sequence*. *Cell*, 1992. **71**(2): p. 201-10.
158. Derbyshire, V., et al., *Genetic definition of a protein-splicing domain: functional mini-inteins support structure predictions and a model for intein evolution*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(21): p. 11466-71.
159. Southworth, M.W., et al., *Purification of proteins fused to either the amino or carboxy terminus of the Mycobacterium xenopi gyrase A intein*. *Biotechniques*, 1999. **27**(1): p. 110-4, 116, 118-20.
160. Evans, T.J.T. and M.Q. Xu, *Mechanistic and kinetic considerations of protein splicing*. *Chem Rev*, 2002. **102**(12): p. 4869-84.
161. Bang, D., N. Chopra, and S.B. Kent, *Total chemical synthesis of crambin*. *J Am Chem Soc*, 2004. **126**(5): p. 1377-83.
162. Arnold, U., et al., *Protein prosthesis: a semisynthetic enzyme with a beta-peptide reverse turn*. *J Am Chem Soc*, 2002. **124**(29): p. 8522-3.
163. Becker, C.F., et al., *Total chemical synthesis of a functional interacting protein pair: the protooncogene H-Ras and the Ras-binding domain of its effector c-Raf1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(9): p. 5075-80.
164. Miller, L.W. and V.W. Cornish, *Selective chemical labeling of proteins in living cells*. *Curr Opin Chem Biol*, 2005. **9**(1): p. 56-61.
165. Giriat, I. and T.W. Muir, *Protein semi-synthesis in living cells*. *J Am Chem Soc*, 2003. **125**(24): p. 7180-1.
166. Brenzel, S. and H.D. Mootz, *Manuscript in preparation*. 2008.
167. Mills, K.V. and H. Paulus, *Reversible inhibition of protein splicing by zinc ion*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(14): p. 10832-8.

168. Ghosh, I., L. Sun, and M.Q. Xu, *Zinc inhibition of protein trans-splicing and identification of regions essential for splicing and association of a split intein\**. J Biol Chem, 2001. **276**(26): p. 24051-8.
169. Hahn, M. and T. Stachelhaus, *Selective interaction between nonribosomal peptide synthetases is facilitated by short communication-mediating domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(44): p. 15585-90.

## 7 Anhang

**Tabelle 10: Zuordnung der Peptidfragmente die durch den tryptischen Verdaus der Bande des Intermediates erhalten wurden. (n.d. = Fragmente die nicht gefunden wurden, PAM = Acrylamidaddukt)**

Berechnete Masse [Da]	Beobachtete Masse [Da]	Peptidsequenz	Zuordnung
2950,45	n.d.	SALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFK	(146-171), MBP
2783,43	2783,59	ISEFGSSSGKPEFAPTTYTVGVPLVR	(388-414), GyrA <sup>C</sup>
2575,11	2575,40	DAQTNSSSNNNNNNNNNNLGIEGR	(364-387), MBP-GyrA <sup>C</sup>
2213,08	2213,36	FPQVAATGDGPDIIFWAHDR	(48-67), MBP
2179,01	2179,25	GETAMTINGPWAWSNIDTSK	(221-240), MBP
2139,16	2139,37	GQPSKPFVGLSAGINAASPNK	(253-274), MBP
2110,02	2110,23	GEIMPNIQMSAFWYAVR	(328-345), MBP
2097,04	2097,24	EFLENYLLTDEGLEAVNK	(279-296), MBP
1897,84	1898,03	HMNADTDYSIAEAAFNK	(204-220), MBP
1891,09	1891,26	LIAYPIAVEALSIIYNK	(104-120), MBP
1802,84	n.d.	YT(Y)EAGSCSHHHHHH	Spleißstelle (Ester zwischen T & Y)
1766,89	1767,05	FGGYAQSGLLAEITPDK	(68-84), MBP
1710,69	n.d.	YTEAGSC(PAM)SHHHHHH	Spleißstelle (ohne Ester)
1661,89	1662,05	VASVTDAGVQPVSRLR	(442-457), GyrA <sup>C</sup>
1639,66	n.d.	YTEAGSCSHHHHHH	Spleißstelle (ohne Ester)
1586,73	1586,87	DPDAQAIDELTDGR	(422-436), GyrA <sup>C</sup>
1337,75	1337,82	VNYGVTVLPTFK	(241-252), MBP
1267,65	1267,76	LYPFTWDAVR	(90-99), MBP
1201,61	n.d.	TWEEIPALDK	(129-138), MBP

1189,72	1189,77	AGLTFLVDLIK	(191-201), MBP
1076,54	n.d.	IAATMENAQK	(318-327), MBP
1057,60	1057,65	LVIWINGDK	(8-16), MBP
1011,62	n.d.	DKPLGAVALK	(297-306), MBP
1007,52	n.d.	GYNGLAEVGK	(17-26), MBP

Tabelle 11: Übersicht über die hergestellten Plasmide

Name	Vektor	Insert	Beschreibung
pTK048	pTK046	DnaBc	pQE60-DnaBc-NSIRSRS-His
pTK049	pQE60	DnaBc-NSIEQGCGRSRS	pQE60-DnaBc-NSIEQGCGRSRS-His
pTK052	pQE60	DnaBc-NSIRSCG-His	pQE60-DnaBc-NSIRSCG-His
pTK053	pTrc99a	MBP-DnaBc-NSIEQGCGRS-His	MBP-DnaBc-NSIEQGCGRS-His
pTK054	pTrc99a	MBP-DnaBc-NSIRSCG-His	MBP-DnaBc-NSIRSCG-His
pTK055	pTrc99a	MBP-DnaBc-NSIRSRS-His	pTK048 + MBP, neg. Kontrolle ohne Cys
pTK056	pTrc99a	pMM1 ohne FKBP	MBP-DnaBn-His
pTK057	pTrc99a	MBP-DnaBn-FKBP-His	MBP-DnaBn-FKBP-His
pTK058	pTrc99a	A-PCP-DnaBn	TyrA-PCP-DnaBn-His
pTK059	pTrc99a	GFP-DnaBn	GFP-DnaBn-His
pTK060	pET16b	A-PCP-DnaBn	pHM121-TyrA-PCP-DnaBn-His (pET16)
pTK061	pET16b	GFP-DnaBn	pHM121-GFP-DnaBn-His (pET16)
pTK062	pET16b	DnaBc-GFP-His	pET16-DnaBc-GFP-His
pTK063	pET16b	MBP-DnaBn-FKBP-His	pET16-MBP-DnaBn-FKBP-His
pTK064	pCL03	PCR of TycA	Strep-TycA
pTK065	pTK058	(ATCC8185) 3270 bp	Strep-TycA-DnaBn-His
pTK066	pET16b	Strep-TycA	pET16-GFP-DnaBn-His
pTK067	pTrc99a	pTK059 + pTK020	TyrA-PCP-DnaBn-FKBP-His
pTK068	pTrc99a	A-PCP-DnaBn-FKBP-His	GFP-DnaBn-FKBP-His
pTK069	pET22b	GFP-DnaBn-FKBP-His	CFFKDEL-GFP-DnaBn-His
pTK071	pET22b	CFFKDEL-GFP-DnaBn-His	CFFKDEL-GFP-DnaBn-FKBP-His
pTK072	pET16b	FKBP-His	A-PCP-DnaBn-FKBP-His
pTK073	pET16b	A-PCP-DnaBn-FKBP-His	GFP-DnaBn-FKBP-His
pTK074	pET16b	GFP-DnaBn-FKBP-His	MBP-DnaBn-His
pTK075	pQE60	MBP-DnaBn-His	pQE60-Bla-DnaBn-His
pTK076	pTrc99a	DnaBn	StrepII-Trx-DnaBn-His
pTK077	pET16b	StrepII-Trx	pET16-Strep-Trx-DnaBn-His
pTK079	pTK059	StrepII-Trx-DnaBn-His	SHP2-DnaBn-His
pTK081	pCL03	SHP2	von Tina
pTK082	pTK059	Strep-TyrA-PCP	Strep-TycA-A-DnaBn-His
pTK083	pTK061	TycA-A-DnaBn-His	pET16b-Bla-DnaBn-His
pTK085	pSB34	Bla-DnaBn	Doppelmutante von SB34 NS---AA
pTK086	pTK054	His6-gpD-DnaBc-Cys	Doppelmutante von pTK054 NS---AA
pTK087	pTK067	MBP-DnaBc-Cys-His	TyrA-PCP-DnaBn-MBP-His
pTK088	pTK068	pTK067 + MBP	GFP-DnaBn-MBP_his
pTK089	pTK056	pTK068 + MBP	MBP-gpD-DnaBn-His
pTK094	pTK079	gpD	pTrc99a-SHP2-DnaBn-MBP-His
pTK095	pTK079	DnaBn-MBP-His	pTrc99a-SHP2-gpD-DnaBn-His
pTK096	pMHTK02	gpD	Strep-TycA-DnaBn-MBP-His
pTK097	pMHTK02	DnaBn-MBP	Strep-TycA-gpD-DnaBn-His
pTK099	pTK083	gpD	pEt16-SHP2-DnaBn-His
pTK101	pET16b	SHP2-DnaBn	pET16-SHP2-gpD-DnaBn-His
		SHP2-gpD-DnaBn-His	

pTK102	pET16b	Strep-TycA-gpD-DnaBn-His	pET16-Strep-TycA-gpD-DnaBn-His
pTK104	pET42b	CFFKDEL-eGFP	pET42-CFFKDEL-eGFP
			pET42-CFFKDEL-eGFP-DnaBn-MBP-His
pTK105	pET42b	DnaBn-MBP-His	His
pTK106	pTrc99a	FRB-DnaBc	XbaI-FRB-DnaBc
pTK107	pMAL	(MBP)-FRB-DnaBc-His	MBP-FRB-DnaBc-His
pTK110	pET16b	MBP-DnaBn-FKBP-His	pET16-MBP-DnaBn-FKBP-His
			SHP2-DnaBn-FKBP-His, FKBP statt MBP
pTK111	pTrc99a	FKBP-His	Strep-TycA-DnaBn-FKBP-His, FKBP statt MBP
pTK112	pTrc99a	FKBP	hGH-DnaBn-His
pTK113	pTrc99a	hGH	MBP-GyrAn-FKBP-His
pTK114	pTrc99a	GyrAn	MBP-FRB-GyrAc-His
pTK115	pTrc99a	GyrAc	GFP-GyrAn-FKBP-His
pTK116	pTrc99a	GFP	Strep-TycA-GyrAn-FKBP-His
pTK117	pTrc99a	Strep-TycA	hGH-GyrAn-FKBP-His
pTK118	pTrc99a	hGH	MBP-GyrAc-His
pTK119	pTrc99a	pA115	MBP-GyrAc-Cys-His
pTK120	pTrc99a	pCL76	MBP-GyrAn-His
pTK121	pTrc99a	pA113	Strep-GyrAc-His
pTK122	pMHTK02	GyrAc	Epo-DnaBn-His
pTK123	pTrc99a	Epo	Epo-GyrAn-FKBP-His
pTK124	pTrc99a	Epo	Strep-GyrAc-Cys-His
pTK125	pMHTK02	GyrAc-Cys-His	Strep-TycA-GyrAn-FKBP
pTK126	pTrc99a	Strep-TycA-GyrAn-FKBP	His6-gpD-DnaBC-SIRSCG
pTK127	pSB34		His10-gpD-DnaBC-SIRSRS-His
pTK128	pSB35		MBP-GyrAn-PCP-His
pTK129	pTrc99a	PCP	Strep-TycA-GyrAn-FKBP, + frame-shift, + AgeI Schnittstelle
pTK130	pTrc99a	Strep-TycA-GyrAn-FKBP	pET16-Strep-TycA-GyrAn-FKBP
pTK131	pET16b	Strep-TycA-GyrAn-FKBP	MBP-DnaBn-GFP-His
pTK132	pTrc99a	GFP	MBP-GyrAn-GFP-His
pTK133	pTrc99a	GFP	

Tabelle 12: Übersicht über die verwendeten synthetischen Oligonukleotide.

Name	Schnittstelle, Funktion	Länge	Sequenz 5' → 3'
oTK14	für pTS2 DnaBc-SIEQGCG (BglII)	46	ATA <u>AGA TCT</u> ACC GCA ACC CTG TTC GAT ACT GTT ATG GAC AAT GAT G
oTK15	5' Mut DnaB NSIRSRS zu NSIRSCG für pTK048	40	CAT AAC AGT ATT AGA TCC TGC GGT CAT CAC CAT CAC CAT C
oTK16	3' Mut DnaB NSIRSRS zu NSIRSCG für pTK048	40	GAT GGT GAT GGT GAT GAC CGC AGG ATC TAA TAC TGT TAT G
oTK17	5' GFP zu GFP-DnaBn-His (NcoI) für pTK058	35	ATA <u>CCA TGG</u> TGA GCA AGG GCG AGG AGC TGT TCA CC
oTK18	3' GFP zu GFP-DnaBn-His (EcoRI, BglII, BamHI) für pTK058	31	ATA <u>GAA TTC</u> AGA TCT GGA TCC CTT GTA CAG C
oTK19	TyrA-PCP zu TyrA-PCP-SG-DnaBn- His (EcoRI) für pTK058,59	39	ATA <u>GAA TTC</u> TCC GCT CGT GGC GAC ATA CTG GGC CAA CGC
oTK20	5' SHP2 zu SHP2(full length)-DnaBn- His (NcoI)	33	ATA <u>CCA TGG</u> CAA CAT CGC GGA GAT GGT TTC ACC
oTK21	3' SHP2 zu SHP2(full length)-DnaBn- His (EcoRI) pTK001	31	ATA <u>GAA TTC</u> TCT GAA ACT TTT CTG CTG TTG C
oTK22	5' TyrA-A-domäne zu TyrA-A- DnaBn-His (NcoI)	33	ATA <u>CCA TGG</u> TAG CAA ATC AGG CCA ATC TCA TCG
oTK23	3' TyrA-A-Domäne zu TyrA-A- DnaBn-His (EcoRI)	31	ATA <u>GAA TTC</u> GGC AGC CTG GCT TTG GTT TGC C
oTK24	gpD 5' (EcoRI) ungerichtet pSB34	30	ATA <u>GAA TTC</u> GCG AGC AAA GAA ACC TTT ACC
oTK25	gpD 3' (EcoRI) ungerichtet falsch	29	ATA <u>GAA TTC</u> AAA CGC GGT CCG TTT TTT CG
oTK26	gpD 3' (EcoRI) ungerichtet pSB34	31	ATA <u>GAA TTC</u> AAC GAT GCT GAT TGC CGT TCC G
oTK27	MBP (SpeI) pTK056 statt FKBP	30	ATA <u>ACT AGT</u> TGA AAT CCT TCC CTC GAT CCC
oTK28	5' GFP (XbaI)	30	ATA <u>TCT AGA</u> GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG
oTK29	5' Mut pSB34 pTK054 NS zu AA Doppelspleißmutante	36	GAC ATC ATT GTC CAT GCG GCG ATT AGA TCC TGC GGT
oTK30	3' Mut pSB34 pTK054 NS zu AA Doppelspleißmutante	36	ACC GCA GGA TCT AAT CGC CGC ATG GAC AAT GAT GTC
oTK31	5' Trx zu Trx-DnaBn-His (NdeI) Daniels Vektor (pDG02 oder 03)	31	ATA <u>CAT ATG</u> GCC TGG AGC CAC CCG CAG TTC G
oTK32	5' β-Lactamase zu β-lac-DnaBn-His Daniel Vektor pDG02 oder 03	31	ATA <u>CAT ATG</u> CAC CCA GAA ACG CTG GTG AAA G
oTK33	3' (NdeI) für Trx(β-Lac)-DnaBn-MBP- His für pDG02 oder pDG03	29	ATA <u>CAT ATG</u> ATA ACT AGA TAA AGA GGA GC
oTK34	3' SHP2 inkl DnaBn (BamH NheI)	67	ATA <u>GGA TCC GCT AGC</u> CAA GCT GAT CAA ACT ATC TCC ACT GAT GCA CGT CTG GTC CGC TAG AGA ATA C
oTK35	5' DnaBn inkl (NheI)	34	ATA <u>GCT AGC</u> ACA GGA AAA AGA GTT TCT ATT AAA G
oTK36	5' DnaBc inkl (EcoRV)	43	ATA <u>GAT ATC</u> ATT GTC CAT AAC AGT GGA GAT CAG AGC CCT CTC C
oTK37	3' SHP2 tail für DnaBc (HindIII)	34	ATA <u>AAG CTT</u> TCA TCT GAA ACT TTT CTG CTG TTG C
oTK38	3' DnaBc inkl EcoRV Schnittstelle (BamHI, EcoRV)	36	ATA <u>GGA TCC GAT ATC</u> ATT GGC GAC AAA GTT ATG TGG
oTK39	5' DnaBc inkl EcoRV Schnittstelle (NdeI)	31	ATA <u>CAT ATG</u> GAA ATC GAA GAA GGT AAA CTG G
oTK40	Epo 5' (NdeI)	31	ATA <u>CAT ATG</u> GCC CCA CCA CGC CTC ATC TGT G
oTK41	Epo 3' (HindIII)	32	ATA <u>AAG CTT</u> ATC TGT CCC CTG TCC TGC AGG CC
oTK42	3' verkürzter Cys-tag SC (HindIII)	39	ATA <u>AAG CTT</u> AGC AAC TGT TAT GGA CAA TGA TGT CAT TGG

oTK43	3' verkürzter Cys-tag SIC (HindIII)	37	ATA <u>AAG CTT</u> AGC AAA TAC TGT TAT GGA CAA TGA TGT C
oTK44	3' verkürzter Cys-tag SICG (HindIII)	40	ATA <u>AAG CTT</u> AAC CGC AAA TAC TGT TAT GGA CAA TGA TGT C
oTK45	5' GyrA split zwischen R109 G110 (EcoRI)	42	ATA <u>GAA TTC</u> CGC TAC TGC ATC ACG GGA GAT GCA CTA GTT GCC
oTK46	3' GyrA N-term split zwischen R und G (XbaI)	35	ATA <u>TCT AGA</u> GCG GGC AAA ACC TGC ACA GTC GAC GC
oTK47	5' Primer GyrA C-term split zwischen R und G (SpeI)	30	ATA <u>ACT AGT</u> GGA AAA CCC GAA TTT GCG CCC
oTK48	5' verkürzter Cystag neu (EcoRI)	26	ATA <u>GAA TTC</u> GGA TCC TCT AGT TCA CC
oTK49	5'hGH_normal (NcoI)	32	ATA <u>CCA TGG</u> GAT TCC CAA CCA TTC CCT TAA GC
oTK50	3' hGH normal (EcoRI)	30	ATA <u>GAA TTC</u> GAA GCC ACA GCT GCC CTC CAC
oTK51	5' hGH RF	51	GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT ATG TTC CCA ACC ATT CCC TTA AGC
oTK52	3' hGH RF	48	ATC TCC ACT GAT GCA GCC GGA GAA TTC GAA GCC ACA GCT GCC CTC CAC
oTK53	5' RF cloning EPO into pTK056	56	CAA TTT CAC ACA CAG GAA ACA GAC CAT GGG AAA AGC CCC GCC GCG CCT TAT TTG CG
oTK54	3' RF cloning Epo into pTK056	49	ATC TCC ACT GAT GCA GCC GGA GAA TTC GCG GTC ACC CGT GCG GCA CGC C
oTK55	3' RF cloning Epo into pSB37	52	GGA TCC CTC TAT GCA CAT AAT TCA GGC CTC GCC CCG CCG CGC CTT ATT TGC G
oTK57	3' RF cloning EPo into pSB37 neu mit Stop codon	51	TGT TTG ACA GCT TAT CAT CGA TAA GCT TAG CGG TCA CCC GTG CGG CAC GCC
oTK58	3'pTK117 (BglII)	27	ATA TTA <u>AGA TCT</u> GGA TCC ATA ACT AGT
oTK59	5' pTK117 (NcoI)	25	ATT <u>CCA TGG</u> CCA GTT GGA GCC ACC C
oTK60	3' pTK117 neu (HindIII, BamHI, SpeI)	43	ATA <u>AAG CTT</u> <u>GGA TCC</u> TTA <u>ACT AGT</u> TTC CAG TTT TAG AAG CTC C
oTK61	5' PCP (XbaI)	31	ATA <u>TCT AGA</u> GCC TAC CAT CCT CCG AGA ACC G
oTK62	3' PCP (BamHI)	31	TAT <u>GGA TCC</u> GCT TTT TCT CGT CGT GCT CTT G
Dirk GyrA 5'	(SpeI) 5' GyrA für an Pos 11 gespalten	27	TTT <u>ACT AGT</u> GAG GGC GAG TCG GTAC GC
Dirk GyrA 3'	(BamHI) für GyrA an Pos 11 gespalten	36	TTT <u>GGA TCC</u> GGC TTC AGT ATT GTG GCT GAC GAA CCC
Mut pTK117 5'	Punktmutagenese pTK117 ohne His	38	CTA GTT ATG GAT CCA GAT AAC ATC ACC ATC ACC ATC AC
Mut pTK117 3'	Punktmutagenese pTK118 ohne His	38	GTG ATG GTG ATG GTG ATG TTA TCT GGA TCC ATA ACT AG
Mut pTK117 5'		40	CTA GTT ATG GAT CCA GAT <u>AAC TAG</u> <u>TCA</u> CCA TCA CCA TCA C
neue Mut pTK117 3'	Mut + (SpeI) + frame-shift	40	GTG ATG GTG ATG GTG ACT AGT TAT CTG GAT CCA TAA CTA G
neue Mut pTK117 3'	Mut + (SpeI) + frame-shift		



## 8 Danksagung

Allen voran danke ich ganz herzlich Herrn Prof. Dr. Henning Mootz für die ständige wissenschaftliche und persönliche Unterstützung, sowie für die Möglichkeit, dass ich als eines der ersten Mitglieder am Aufbau und der Entwicklung der Arbeitsgruppe beteiligt sein durfte. Dabei haben insbesondere seine ständige Hilfsbereitschaft, sowie sein nie endendes Repertoire an neuen Ideen zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel möchte ich für die weitere freundschaftliche Verbundenheit zu unserer Arbeitsgruppe, sowie für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Herrn Prof. Dr. N. Hampp und Herrn Prof. Dr. E. Meggers danke ich dafür, dass sie sich als Mitglieder der Prüfungskommission zur Verfügung gestellt haben.

Mein besonderer Dank gilt hier natürlich auch dem gesamten AK Mootz für zahlreiche gemeinschaftliche Aktivitäten und für gemeinsame angenehme, aber auch anstrengende Laboralltage. Besonders in Erinnerung bleiben dabei wohl diverse tägliche Fluchausbrüche von Steffen Brenzel und der unermüdliche Einsatz von Joachim Zettler und Tim Sonntag zur Organisation von Grillabenden.

Mein Dank gilt außerdem Dr. Uwe Linne und Joachim Zettler für deren Hilfestellung bei der Massenspektrometrie, Tm Sonntag für seine Hilfe bei Klonierungsproblemen, sowie allen anderen die an dieser Arbeit in irgendeiner Weise beteiligt waren. Besonders zu Dank verpflichtet bin ich dabei den zahlreichen Vertiefungs- und Bachelorstudenten, sowie allen, die an der schnellen und kritischen Durchsicht dieser Arbeit beteiligt waren.

Bei Dr. Michael Sokolovoski, Christian Grass, Dr. Björn Wagner, Dr. Georg Schönafinger, Dr. Frank Wiegeshoff, Ina Hoyer und Stefan Samel möchte ich mich ganz herzlich für die vielen fröhlichen Abende bei diversen Gelegenheiten bedanken.

Justus, Peter und Bob, sowie der Deutschen Fußballnationalmannschaft danke ich für spannende und entspannende Abende.

Meiner Freundin Maraike danke ich ganz herzlich für die ständige liebevolle Unterstützung und die vielen gemeinsam verbrachten Stunden, Abende und Tage.

Mein größter Dank gebührt allerdings meinen Eltern, auf deren volle Unterstützung ich mich in all den Jahren immer verlassen konnte, sowie meiner Schwester Natalie und meiner ganzen Familie.

## Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

*„Entwicklung einer neuen Methode zur chemo- und regioselektiven Cys-tag Modifikation von Proteinen mithilfe von gespaltenen Inteinen“*

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

---

(Ort, Datum)

---

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)